

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**EVALUACIÓN DE COMPUESTOS ANTITUMORALES
DIRIGIDOS CONTRA TUBULINA E IMPLICACIÓN EN
LOS MECANISMOS ESTRUCTURALES DE
CONTROL DEL CITOESQUELETO**

Memoria presentada por

Francisco de Asís Balaguer Pérez

Para optar al grado de Doctor en el programa de Doctorado en
Biociencias Moleculares

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**EVALUACIÓN DE COMPUESTOS ANTITUMORALES
DIRIGIDOS CONTRA TUBULINA E IMPLICACIÓN EN LOS
MECANISMOS ESTRUCTURALES DE CONTROL DEL
CITOESQUELETO**

Memoria presentada por

Francisco de Asís Balaguer Pérez

Para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares

Madrid, 2019



Trabajo realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas
CSIC

Director:

Dr. José Fernando Díaz Pereira

Codirector:

Dr. Fernando Josa Prado

Resumen

Los microtúbulos (polímeros de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina) son uno de los principales componentes del citoesqueleto. Estos polímeros son esenciales para la división celular, así como para otras funciones cruciales de la célula. Para poder realizar dicha función, la tubulina mantiene un ciclo dinámico de polimerización/despolimerización controlado por la actividad GTPasa de la subunidad de β -tubulina. Debido al papel de los microtúbulos en el crecimiento y vascularización de los tumores, constituyen una diana para la quimioterapia antitumoral, siendo los ligandos dirigidos frente a tubulina uno de los grupos de fármacos con mejores resultados frente a varios tipos de tumores. Además, debido a la gran cantidad de toxinas anti-tubulina generadas por animales y plantas como mecanismo de defensa, existen hasta seis sitios de unión en tubulina, así como una gran variedad de quimiotipos diferentes. Este trabajo está centrado en la caracterización de dos grupos de fármacos dirigidos contra dos de estos sitios de unión.

En la primera parte de este estudio se describe el compuesto Li5, un ligando que se une al sitio de colchicina con la mayor afinidad descrita para este sitio de unión, y que posee un novedoso mecanismo de activación basado en su estado redox, además de una baja toxicidad *in vivo*. El compuesto fue descubierto como parte de un cribado frente a líneas de linfoma DLBCL. El mecanismo de acción del Li5 ha sido caracterizado a nivel estructural, bioquímico y celular. El compuesto se une a tubulina de forma dependiente de su estado redox, siendo la forma oxidada inactiva. En la forma reducida activa, el ligando puede adoptar dos conformaciones enantioméricas posibles, siendo solo una de ellas capaz de unirse a la diana. Los estudios estructurales han permitido probar que solo la forma enantiomérica S se une al sitio de colchicina. Estos resultados sugieren que el Li5 es un prometedor antimitótico debido a su alta afinidad en tubulina (ideal para generar fármacos conjugados con anticuerpos), su baja toxicidad en ratones y su habilidad para superar mecanismos de resistencia a fármacos por sobreexpresión de transportadores de membrana.

La segunda parte de este trabajo se centra en el mecanismo estructural de activación de la tubulina por compuestos de unión covalente (los cuales son interesantes también para conjugarlos con anticuerpos). La estructura a alta resolución del complejo tubulina-ciclostrepina da información sobre los cambios estructurales implicados en la inducción de la estabilización generada por este ligando. El compuesto altera la estructura generando una transición del bucle T5, mimetizando el estado que posee cuando se encuentra GTP unido a la β -tubulina, a pesar de tener GDP en el sitio de nucleótido, permitiendo así la activación de la tubulina debido a un efecto alostérico. Este mecanismo es diferente al descrito previamente en otros taxanos, los cuales promueven el ensamblaje al modular la estructuración del bucle M en un plegamiento helicoidal. Finalmente, este trabajo ahonda en el mecanismo de resistencia a fármacos frente a tubulina por sobreexpresión del isotipo β III, indicando que este mecanismo se debe a un aumento de la capacidad dinámica de los microtúbulos, el cual contrarresta la estabilidad promovida por los ligandos covalentes del sitio de taxanos.

Summary

Microtubules (polymers of tubulin $\alpha\beta$ -heterodimers) are one of the major components of the cell cytoskeleton. These polymers are essential for cell division, as well as for other critical cell functions. In order to perform its function, tubulin holds a dynamic polymerization/depolymerization cycle controlled by the GTPase activity of the β -tubulin subunit.

Due to the role of microtubules functions in the growth and vascularization of tumours, they constitute an obvious target for anti-cancer chemotherapy, being tubulin modulators one of the most successful targets the treatment of many tumours. Moreover, tubulin modulation is as well a successful strategy for self-defense of sessile animals and plants, being this reflected in six different druggable sites in tubulin, to which a large variety of chemotypes bind. This work is focused in the characterization of two novel chemotypes targeting two of these binding sites.

The first part of this study describe Li5, a colchicine binding site compounds with one of the highest affinity for this binding site described, a novel redox based activation mechanisms, and low in vivo toxicity. The compound was discovered as part of a screening project for compounds targeting DLBCL cell lines. The mechanism of action of the compound was characterized employing structural, biochemical and cell biology approaches. This compound binds to tubulin in a redox-dependent manner being the oxidized form inactive. In the active reduced form, the ligand can adopt two different enantiomeric conformations being only one of them active. The structural studies allowed us to proof that only the S enantiomer binds to the pocket. The results suggests that Li5 is a promising antimitotic ligand due to its high affinity for the tubulin (which is an ideal property for drug antibody conjugates), the low toxicity showed in mice and its ability to overcome the multidrug resistance mechanism based on membrane transports overexpression.

The second part of this work aims the understanding of the structural mechanism of tubulin activation by covalent binders (another type of compounds that can be employed in drug antibody conjugates). In order to do so we characterize the binding of cyclostreptin, a well-known covalent binder of the taxol binding site. The high resolution structure of the tubulin-cyclostreptin complex enlightened the structural changes implicated in the stabilization induction of this compound. The compound alters the structure of the switch T5 loop to mimic a GTP-binding state in despite having GDP bound in the nucleotide site, thus activating tubulin through an allosteric effect. The mechanism described is different to this observed previously for other taxane binding ligands both covalent and non-covalent (epothilone, zampanolide), which promote assembly by structurally modulating other switch, the M-loop, into a folded helical structure. Finally the study shed light into a common resistance mechanism against tubulin targeting drug (β III-tubulin overexpression), indicating that β III overexpression resistance is mediated by an increase of microtubule dynamicity counteracting the stability promoted by covalent taxane-ligands.

Índice

Resumen.....	4
Summary	5
Índice	6
Abreviaturas	9
1. Introducción	12
1.1. El cáncer como problema de salud global.....	12
1.2. El cáncer como enfermedad	13
1.3. Tratamiento del cáncer	15
1.3.1. Quimioterapia del cáncer.....	17
1.4. Microtúbulos como diana antitumoral	20
1.4.1. Estructura y función de los microtúbulos	20
1.4.2. Isotipos de tubulina presentes en los microtúbulos	24
1.4.3. Agentes tumorales frente a microtúbulos	25
1.4.3.1. Sitio de unión del paclitaxel	26
1.4.3.2. Sitio de unión de colchicina.....	27
1.4.3.3. Dominio Vinca o sitio de Vinblastina.....	28
1.4.3.4. Sitio del pelurosido/laulimalida	29
1.4.3.5. Sitio de maytansina	30
1.4.3.6. Sitio de pironetina	31
1.5. Mecanismos de resistencia a fármacos dirigidos frente a tubulina.....	32
2. Objetivos	33
3. Materiales y Métodos	34
3.1. Productos químicos, tampones, ligandos y líneas celulares	34
3.1.1. Productos químicos.....	34
3.1.2. Tampones.....	34
3.1.3. Ligandos.....	35
3.1.4. Líneas celulares	40
3.2. Proteínas	41
3.2.1. Purificación de tubulina	41
3.2.2. Estabilización de microtúbulos.....	41
3.2.3. Determinación de sitios de unión en microtúbulos estabilizados	42

3.2.4. Purificación de Tubulina Tirosina Ligasa (TTL).....	42
3.2.5. Purificación de RB3.....	43
3.3. Ensayos de biología celular	43
3.3.1. Ensayos de citotoxicidad	43
3.3.2. Ciclo celular	44
3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta.....	44
3.4. Caracterización de los compuestos	45
3.4.1. Espectrofotometría en el espectro ultravioleta-visible.....	45
3.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	45
3.4.3. Cuantificación de la ciclostreptina por espectrometría de masas	45
3.4.4. Determinación de la solubilidad.....	46
3.4.5. Determinación de la actividad óptica del Li5 por dicroísmo circular	46
3.5. Determinación de la unión a tubulina por espectrofluorimetría	46
3.6. Separación de los enantiómeros del Li5 por su actividad	46
3.7. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina	47
3.7.1. Efecto de los ligandos sobre la concentración crítica	47
3.7.2. Efecto de los ligandos sobre la polimerización por turbidez	47
3.7.3. Ensayos de microscopía electrónica (MET)	48
3.8. Ensayos de interacción tubulina-ligando	48
3.8.1. Unión del Li5 a tubulina dimérica y ensayo de desplazamiento con podofilotoxina medido por HPLC.....	48
3.8.2. Unión a polímeros de tubulina y ensayo de desplazamiento con colchicina por HPLC	49
3.8.3. Unión a microtúbulos estabilizados y ensayo de desplazamiento con colchicina/podofilotoxina por HPLC.....	49
3.8.4. Ensayos de unión a dímeros y al complejo Tubulina-RB3 (T2R) por ultracentrifugación analítica (AUC)	49
3.8.5. Determinación de la estequiometría de unión a microtúbulos nativos	50
3.8.6. Caracterización de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica	50
3.9. Cálculo de la constante de afinidad del Li5 utilizando HPLC-AUC.....	51
3.10. Ensayos de cristalografía de rayos X	51
3.10.1. Formación del complejo T2RT y la cristalización.....	51
3.10.2. Recogida de datos y procesamiento	52
3.11. Análisis de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica por espectrometría de masas (MS)	55

3.12. Análisis bioinformático.....	56
3.12.1. Análisis de la interacción Li5-tubulina mediante dinámica molecular.....	56
3.12.2. Análisis de la interacción de los compuestos XH5094 y XH5085-3 mediante acoplamiento molecular	57
4. Resultados	58
4.1. Caracterización del Li5 y derivados	58
4.1.1. Cribado de los compuestos	58
4.1.2. Análisis de las propiedades biofísicas de los compuestos activos	59
4.1.3. Efecto de los ligandos a nivel celular	62
4.1.4. Determinación de la unión a tubulina <i>in vitro</i>	67
4.1.5. Análisis de la actividad óptica del compuesto Li5	69
4.1.6. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de la tubulina	72
4.1.7. Análisis de la oligomerización inducida por el Li5	73
4.1.8. Determinación del sitio de unión y de la unión a diferentes estados de agregación	75
4.1.9. Determinación de la estequiometría de unión a polímeros de tubulina y en el complejo T2R.....	78
4.1.10. Determinación de la constante de afinidad	80
4.1.11. Determinación de la estructura del complejo tubulina-ligando por cristalografía de rayos X.....	81
4.1.12. Análisis bioinformático de las interacciones de los ligandos con la tubulina	83
4.2. Caracterización de la unión de la ciclostreptina a tubulina	86
4.2.1. Caracterización de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica	86
4.2.2. Determinación de la estructura de los complejos ciclostreptina-tubulina	88
4.2.3. Determinación de la unión de la ciclostreptina por espectrometría de masas (MS/HPLC)	91
4.2.4. Comparación de la capacidad de ensamblaje de los ligandos covalentes del sitio de taxol.....	92
4.2.5. Citotoxicidad de los distintos ligandos covalentes en células resistentes a taxol	93
5. Discusión	95
5.1. Análisis del compuesto Li5 y sus derivados.....	95
5.1.1. Li5 es un compuesto con actividad antimetabólica dirigido contra el sitio de colchicina en tubulina	95
5.1.2. La actividad del Li5 depende de su estado redox a través de la conformación del C7.....	96
5.1.3. El Li5 se une a la tubulina de forma similar a otros compuestos del sitio de colchicina como la podofilotoxina.....	97

5.1.4.	Las interacciones con la β Thr179 y la β Cys239 son esenciales para la actividad del Li5.....	99
5.1.5.	El compuesto Li5 es eficiente en células resistentes a quimioterapia y muestra baja toxicidad en ratones	101
5.2.	Análisis del efecto de compuestos covalentes del sitio de taxol	103
5.2.1.	La ciclostreptina se une de forma covalente a la β His229.....	103
5.2.2.	La ciclostreptina no produce estructuración del bucle M.....	104
5.2.3.	La ciclostreptina produce un cambio en el bucle T5.....	106
5.2.4.	Relación entre cambios estructurales, el poder de ensamblaje y la citotoxicidad en ligandos covalentes del sitio de taxol.....	107
5.2.5.	La utilización de ligandos covalentes permite analizar los mecanismos de resistencia por sobreexpresión del isotipo β III	107
6.	Conclusiones.....	109
7.	Bibliografía	110

Abreviaturas

ABC	Proteína transportadora con motivo de unión a ATP
ACN	Acetonitrilo
AMPPCP	β,γ -Metilenadenosín-5'trifosfato.
AUC	Ultracentrifugación analítica).
BSA	Seroalbúmina bovina
CCD	Dispositivo de cargas acopladas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50.
Cr	Concentración crítica.
D ₆ -DMSO	Dimetilsulfóxido deuterado.
DCM	Diclorometano
DEAE	Dietilaminoetil celulosa.
DMF	N,N-dimetilformamida.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético.
EGTA	Ácido glicol-éter-diaminotetraacético.
FBS	Suero fetal bovino.
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
Flutax-2	7-O-[2,7-difluoro-4'-(fluoresceín-carbonil)-L-alanil]-paclitaxel.
GAB	Tampón de ensamblaje con glicerol.
GDP	Guanosín difosfato.
gp-P	glicoproteína-P.
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etanosulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.
K _a	Constante de unión. Constante de afinidad.
mAbs	Anticuerpos monoclonales.
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos.
MDA	Agentes desestabilizantes de microtúbulos.
MDR	Resistencia múltiples a drogas.
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico.
MET	Microscopio electrónico de transmisión.
MSA	Agentes estabilizantes de microtúbulos.
MTAs	Agentes dirigidos a tubulina.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
NaPi	Fosfato sódico.
PBS	Tampón fosfato salino.
PBST	Tampón fosfato salino suplementado con 0.05% Tween TM .
PEG	Polietilenglicol.
PGP	glicoproteína-P
PIPES	Ácido 1,4-piperazin-dietanosulfónico.

R/S	Índice de resistencia.
Rmsd	Raíz de la desviación cuadrática media.
s	Coeficiente de sedimentación.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
T ₂ R	Tetramero de tubulina unido a la proteína RB3.
T ₂ RT	Complejo T ₂ R unido a la proteína TTL.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TTL	Tubulina-tirosina ligasa.
u. a.	Unidades arbitrarias.
UI	Unidades internacionales.

1

Introducción

1.1. El cáncer como problema de salud global

El término cáncer engloba a una gran variedad de enfermedades que comparten como características comunes el crecimiento incontrolado de las células y la capacidad de estas de dispersarse por el organismo. Este conjunto de enfermedades constituye una de las principales causas de muerte en el mundo, independientemente del nivel de desarrollo. Existen diferentes factores que determinan su mayor o menor incidencia como son la dieta, la actividad física o el consumo de sustancias nocivas como alcohol y tabaco (Vineis and Wild, 2014). Es destacable que a lo largo de las últimas décadas se ha visto un incremento progresivo de la incidencia del cáncer relacionado principalmente con un mayor incremento de las sustancias nocivas ambientales, aunque existen otros factores directamente relacionados como son la mayor esperanza de vida y la mejora en los diagnósticos. Del conjunto de tipologías de cáncer, los que tienen mayor incidencia y mortalidad son: pulmón, colorrectal, hígado, mama, orofaríngeo y estómago (Torre et al., 2016). Según datos de 2018 de la organización mundial de la salud (www.who.int), se producen 2.09 millones de muertes al año por cáncer de pulmón y vías respiratorias, lo que supone la sexta causa de muerte. A pesar del mencionado incremento en incidencia, la tasa de mortalidad debida al cáncer no ha aumentado (Figura 1). Este hecho se asocia a la mejora de los tratamientos utilizados, así como el descubrimiento de nuevos tipos de tratamiento y dianas antitumorales. Otros factores relevantes que han contribuido a disminuir la mortalidad del cáncer han sido la mejora en los sistemas de diagnóstico y las campañas de prevención.

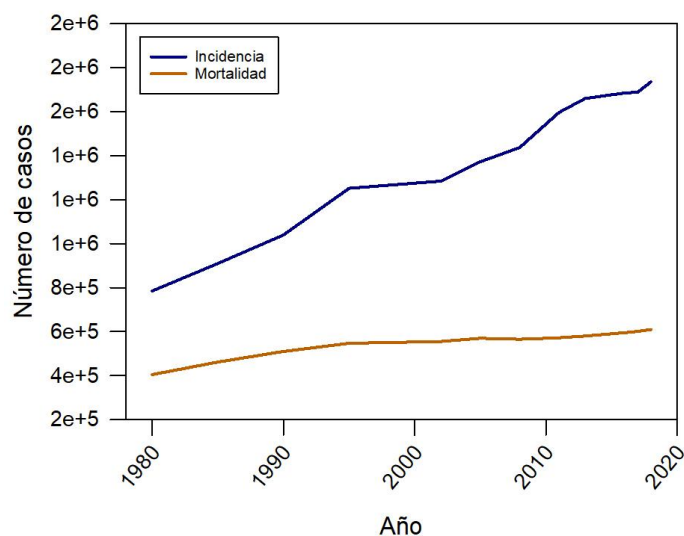


Figura 1: Estimación de la evolución de incidencia y mortalidad del cáncer en Estados Unidos desde 1980 a 2018 (Jemal et al., 2005; Jemal et al., 2002; Siegel et al., 2013; Siegel et al., 2018; Silverberg, 1980, 1985; Silverberg et al., 1990). Datos basados en los casos de todos los tipos de cáncer en ambos sexos.

A pesar de este descenso en la mortalidad, el progresivo aumento de la incidencia unido a la aparición de resistencia a fármacos por parte de las células tumorales, hacen necesaria una continua inversión en investigación dentro del campo de la farmacología del cáncer, así como una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que determinan la aparición, desarrollo y diseminación de los tumores.

1.2. El cáncer como enfermedad

La transformación de una célula normal hasta convertirse en una célula tumoral es causada por la interacción entre agentes ambientales y componentes genéticos. Esto hace de la tumorigénesis un proceso multifactorial y a menudo singular para cada patología asociada al mismo. Dentro del grupo de los componentes ambientales podemos hablar de tres tipos de agentes: los agentes físicos (p. ej: radiación ultravioleta), los químicos (p. ej: tabaco) y los biológicos (p. ej: virus del papiloma humano). La presencia de estos agentes induce mutaciones en genes implicados en procesos de regulación de la división celular como son: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes que codifican para proteínas implicadas en reparación del ADN (Lee and Muller, 2010). Se calcula que en el momento de la detección de un cáncer, hay alrededor de unas 30-60 mutaciones somáticas acumuladas que alteran diferentes proteínas, las cuales confieren a las células tumorales las características necesarias para evadir la muerte celular programada por apoptosis y los mecanismos de defensa inmunológicos (Figura 2). Como veremos más adelante los tratamientos quimioterapéuticos están enfocados a bloquear alguna de las características de las células tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011).

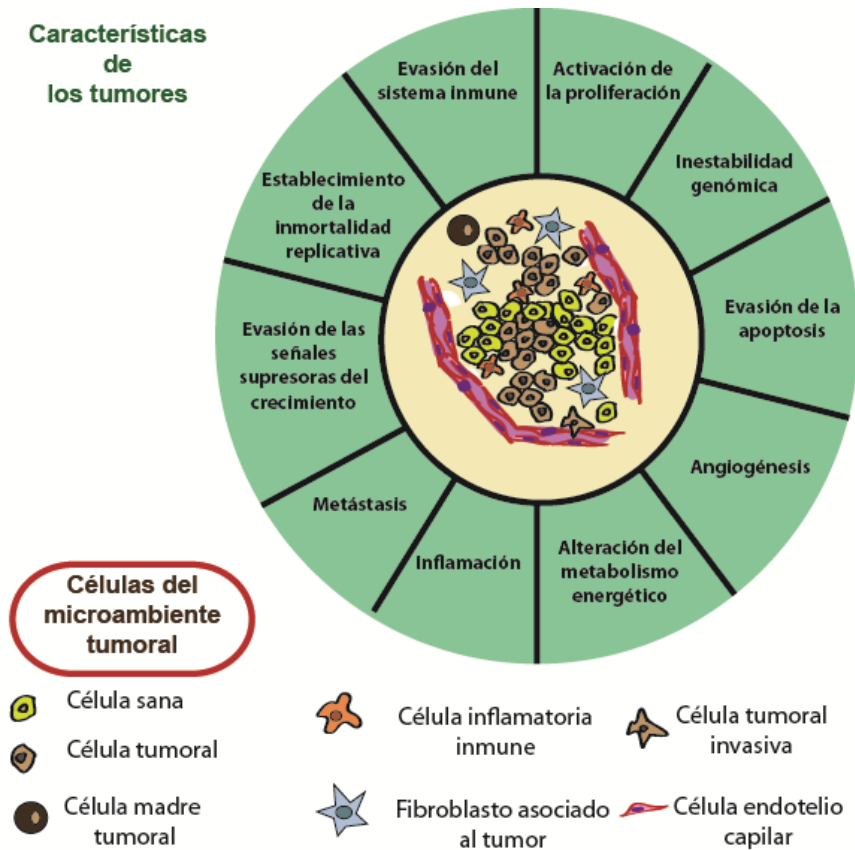


Figura 2: Esquema representando todas las características diferenciales de las células tumorales con respecto de las fisiológicamente normales. Dentro del tumor se genera un microambiente en el cual podemos encontrar diferentes tipos celulares. Por un lado encontramos células tumorales tanto invasivas como no invasivas, y por otro lado células implicadas en la inflamación asociada al tumor y en la angiogénesis. Imagen adaptada de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Cuando las células sufren alguna modificación en estos genes se produce un crecimiento descontrolado y una evasión de la apoptosis, acompañada, además, de otros procesos como la inducción de la angiogénesis (vascularización de la zona tumoral para incrementar el aporte de nutrientes de las células tumorales), la evasión del sistema inmune, la invasión de otros tejidos y la insensibilidad a señales anti-proliferativas (Hanahan and Weinberg, 2011).

Dentro de estos procesos, la metástasis constituye el principal motivo de la mortalidad en cáncer, así como el mayor reto terapéutico en este ámbito (Fidler and Kripke, 2015; Steeg, 2016). Se define metástasis como la capacidad de una célula tumoral de desplazarse desde su sitio primario hacia otro órgano distante y colonizarlo generando un tumor secundario (Figura 3). El principal problema de este proceso es que en la mayor parte de los casos, una vez diagnosticado el cáncer, la metástasis ya se ha producido, dificultando así el tratamiento de la enfermedad (Talmadge and Fidler, 2010).

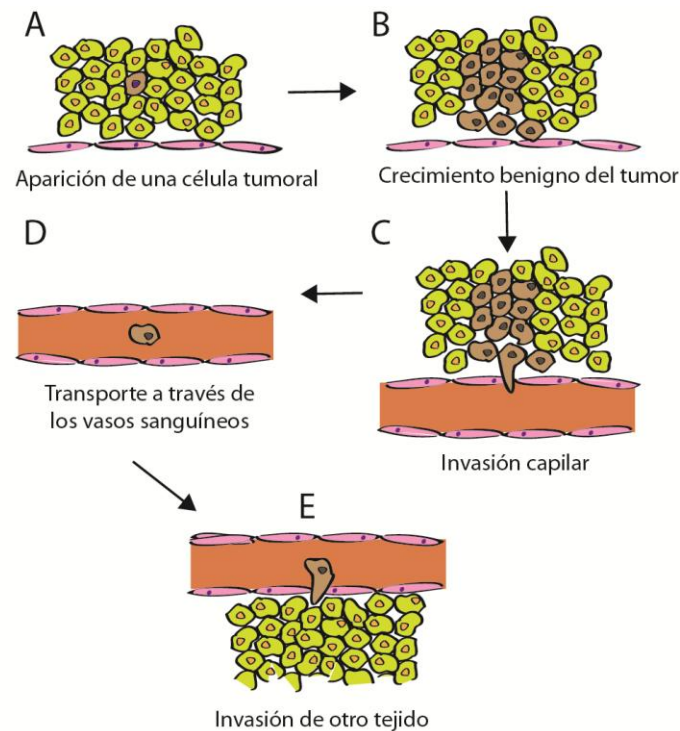


Figura 3: Representación esquemática del proceso de malignización de una célula tumoral terminando con la metástasis. **A)** Aparición de una célula con características tumorales debida a procesos de mutagénesis. **B)** Crecimiento benigno del tumor a nivel localizado. **C)** Aumento de la vascularización en la zona y pérdida de adhesión de alguna célula generando la invasión capilar **D)** Transporte sanguíneo de la celular tumoral hacia otros tejidos. **E)** Invasión y colonización de otro tejido por la célula tumoral generando un tumor en una localización secundaria.

1.3. Tratamiento del cáncer

El tratamiento del cáncer se basa principalmente en el uso de la cirugía, radioterapia y quimioterapia, aunque hay otro tipo de terapias como la inmunoterapia, cuya utilización en clínica es cada vez más relevante (Figura 4). Durante mucho tiempo la cirugía fue la única técnica disponible para el tratamiento de tumores y a día de hoy suele ser el tratamiento seleccionado para tumores benignos o tumores sólidos, localizados y de fácil extirpación (Wyld et al., 2015). Aunque la cirugía es una técnica invasiva, se han realizado notables mejoras para reducir el daño asociado al procedimiento quirúrgico, como el uso de laser (Pukander et al., 2001) o la criocirugía para tumores superficiales (Cranwell and Sinclair, 2017).

Otra técnica cotidiana de tratamiento físico del cáncer es la radioterapia que se basa en el uso de radiación ionizante dirigida hacia el tumor para destruir las células físicamente. En estos tratamientos se usan normalmente rayos X como fuente de radiación, aunque cada vez se utiliza más la terapia de protones, la cual permite aumentar las dosis en el tumor y reducir los efectos nocivos de las zonas sanas adyacentes (Holtzman et al., 2019).

Tanto la cirugía como la radioterapia siguen siendo utilizadas a día de hoy para tumores localizados pero no son tratamientos útiles para casos donde el tumor se ha

diseminado por metástasis hacia otros tejidos. Además, al ser tratamientos físicos agresivos, suelen ser bastante invasivos para el paciente, por lo que en muchas ocasiones donde los tumores se encuentran de forma más interna o difusa en el organismo, es recomendable utilizar otras aproximaciones terapéuticas. Para estos casos es necesario utilizar algún tratamiento dirigido contra el tumor, siendo lo más frecuente el uso de compuestos químicos (quimioterapia) de diversos orígenes que afectan de forma diferencial la viabilidad de las células tumorales. Existe una clase de quimioterapia que por sus características especiales se engloba dentro de lo que se conoce como “hormonoterapia”. Este tipo de tratamiento consiste en la utilización de compuestos químicos que interfieren en rutas hormonales, siendo útil en el caso de ciertos tipos de tumores, como el de mama (Brain et al., 1999) y próstata (Pronzato and Rondini, 2005), donde son las alteraciones en la regulación hormonal las responsables del desarrollo del tumor. El mecanismo de acción de estos compuestos se basa, o bien en el bloqueo de los receptores hormonales, o bien en la inhibición de la producción hormonal (Kang et al., 2018). Puesto que este tipo de tumores son dependientes de hormonas, al bloquear esta vía, pierden la capacidad de crecer y desarrollarse.

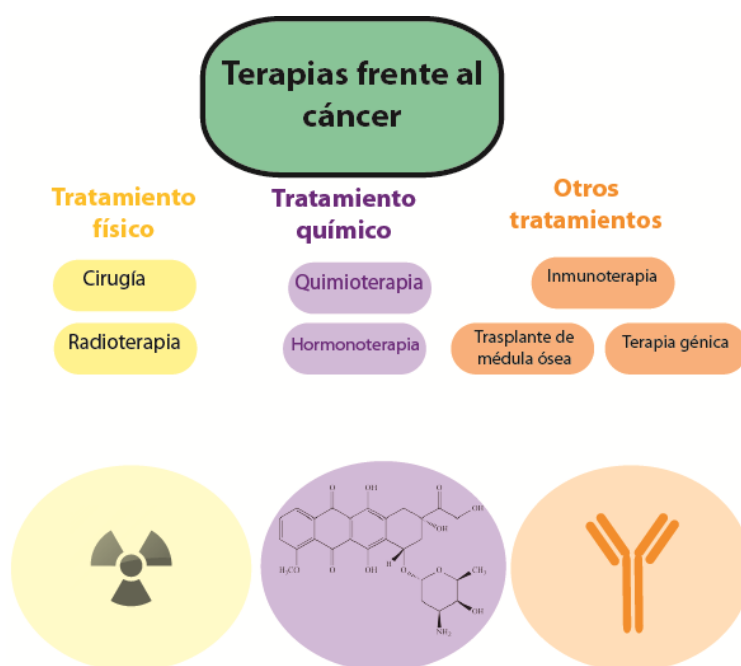


Figura 4. Esquema representativo de diferentes aproximaciones clínicas para el tratamiento del cáncer. Los dos grandes pilares terapéuticos del cáncer son el uso de agentes físicos para la eliminación del tumor (cirugía y radioterapia) y el uso de compuestos químicos con actividad antitumoral (quimioterapia y hormonoterapia). Otros tratamientos menos extendidos son la inmunoterapia, la terapia génica o el trasplante de médula ósea.

Además de los tratamientos físicos y químicos, existen otros tipos de tratamientos como son el trasplante de médula ósea, la terapia génica y la inmunoterapia (Figura 4). El trasplante de médula ósea es utilizado en pacientes con leucemia con el objeto de sustituir las células precursoras hematopoyéticas con actividad tumoral por las de un donante sano (Seclen, 2014). Por otro lado, la terapia génica consiste en la modificación genética principalmente mediante supresión de oncogenes o adición de genes supresores de tumores a través de un vector (Ogris,

2010). Recientemente se han conseguido avances significativos en cuanto modificación genética de células a nivel preclínico mediante el uso del sistema CRISPR/Cas9 (Yang et al., 2018; Zhan et al., 2018). Aún así, este tipo de terapia no está aún lo suficientemente desarrollada como para ser una opción terapéutica extendida, principalmente por cuestiones de bioseguridad y por la baja eficiencia en la inserción y expresión del transgén (Das et al., 2015). Por último, la inmunoterapia incluye diversas aproximaciones todas ellas relacionadas con mejorar la respuesta del sistema inmune contra las células tumorales. Este tipo de tratamientos van desde la utilización de agentes inmunomoduladores como las citoquinas (Mata-Molanes et al., 2017) al uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el tumor (Julien et al., 2011).

1.3.1. Quimioterapia del cáncer

La quimioterapia es el uso de agentes químicos para el tratamiento de distintos procesos patológicos. En un sentido más estricto hablamos de quimioterapia contra el cáncer cuando se utilizan compuestos que poseen toxicidad diferencial ante la célula tumoral y la célula sana. Esto se consigue mediante el uso de compuestos dirigidos a procesos necesarios para el crecimiento y diseminación del tumor como la división celular o la angiogénesis. Las diferentes aproximaciones quimioterapéuticas pueden clasificarse en función de la diana celular sobre la que actúan (Figura 5). Estas moléculas producen la muerte celular a través de diferentes vías de acción, como son: alquilación del ADN, inhibición de topoisomerasas e interrupción de rutas de señalización celular. A pesar de los avances tecnológicos y del uso de química combinatoria, todavía siguen siendo especialmente importante los compuestos antiproliferativos de origen natural. De hecho, alrededor de un 60% de los compuestos utilizados como anticancerígenos tienen su origen en diversas fuentes naturales (da Rocha et al., 2001; Dall'Acqua, 2014). La mayor parte proceden de microorganismos o de organismos pluricelulares con escasa movilidad, como plantas o esponjas. Esto se debe a que estos organismos se han adaptado evolutivamente para producir a través de su metabolismo secundario compuestos anti-mitóticos que actúen como toxinas para los depredadores. Dentro de los compuestos de origen natural son especialmente interesantes aquellos de origen marino, ya que en estos organismos los compuestos presentan mayor afinidad por sus dianas, para poder compensar el efecto de dilución existente en el ambiente acuoso donde se encuentran. Además, se prevé un mayor descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos de origen marino, ya que los océanos constituyen un 70% de la superficie terrestre y comprenden alrededor de un 95% de la biosfera (Altmann, 2017; Jimenez et al., 2018).

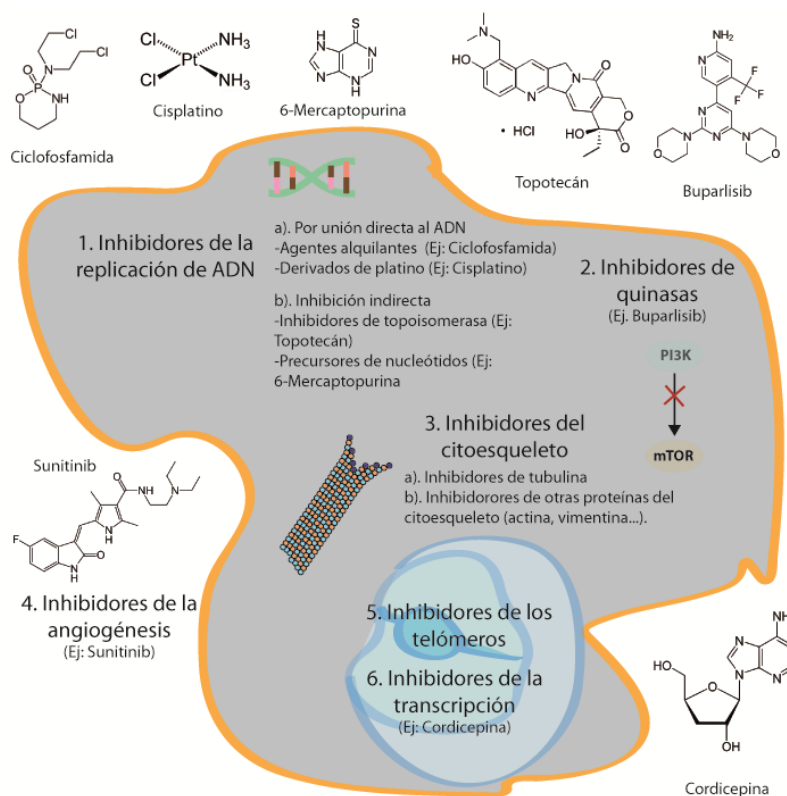


Figura 5: Esquema de las diferentes dianas quimioterapéuticas utilizadas en la actualidad mostrando la estructura química de algunos ejemplos representativos. La utilización de una diana u otra depende de la tipología del tumor, aunque normalmente la tendencia es la utilización de una combinación de diversos fármacos para reducir la generación de resistencias.

Dentro de los agentes quimioterapéuticos, un primer grupo está constituido por aquellos que inhiben la replicación del ADN, bien uniéndose a este, o bien uniéndose a proteínas implicadas en este proceso y bloqueándolo (Figura 5). Entre los que se unen al ADN, destacan los agentes alquilantes y los derivados de platino. Los agentes alquilantes son sustancias que tienen alta afinidad por el ADN, uniéndose a éste mediante la formación de puentes intra- o intercatenarios, lo que inhibe su replicación. Algunos ejemplos destacables son la doxorrubicina o la ciclofosfamida, que fue el primer agente antitumoral usado clínicamente y desarrollado a partir del “gas mostaza” (Coggins et al., 1960). En cuanto a los derivados de platino, se trata de un grupo de compuestos coordinados con platino, que poseen capacidad de unirse de forma covalente a las bases púricas. El primero de esta clase de compuestos en ser aceptado en clínica fue el cisplatino (cis-dicloroaminoplatino) (Kelland, 2007), tras lo cual se han producido numerosos compuestos de coordinación utilizando platino y otros metales, como el paladio, para el tratamiento de diversos tumores (Frezza et al., 2010). En cuanto a aquellos compuestos que inhiben de forma indirecta la replicación del ADN, cabe destacar los inhibidores de topoisomerasas (Nitiss, 2009), así como ciertos fármacos que actúan como precursores de nucleótidos bloqueando la síntesis del ADN como, el metotrexato, el 5-fluorouracilo o la 6-mercaptopurina (Buxo et al., 2018).

Un segundo grupo importante de agentes antitumorales es el de los inhibidores de quinasas. Desde el descubrimiento de la primera quinasa en 1968 (Walsh et al., 1968), se han caracterizado más de 500 proteínas de esta familia en humanos (Duong-Ly and Peterson, 2013; Manning et al., 2002). Las quinasas intervienen regulando redes de señalización celular que median en numerosos procesos celulares como son la proliferación celular, la diferenciación o la supervivencia, siendo por tanto claves para la propagación de las células neoplásicas (Drake et al., 2014). Desde el punto de vista estructural poseen un dominio de unión a ATP que es diana de gran parte de los fármacos que se utilizan como inhibidores (Tong and Seeliger, 2015). Se conocen gran cantidad de inhibidores dentro de esta categoría, algunos de ellos afectan a receptores de membrana y otros actúan a nivel de proteínas citosólicas. El principal problema de este grupo de antitumorales es que la frecuencia de aparición de las resistencias a fármacos es muy alta, debido principalmente a la redundancia de las rutas de señalización celular. Cuando se inhibe una quinasa y por tanto la ruta en la que interviene, ésta puede desviarse y otra quinasa puede suplir la función de la que está inhibida (Luo and Fu, 2014).

Un tercer grupo estaría formado por compuestos que interfieren en el proceso de división celular. Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores del citoesqueleto de tubulina, sobre los que trata este trabajo y de los que se hablará detalladamente en los siguientes capítulos de la introducción. Al haber una tasa de división mayor en células tumorales que en células normales, éstas se ven diferencialmente afectadas ante este tipo de ligandos. La ventaja que presentan estos ligandos con respecto a otros inhibidores tumorales, es que tubulina es una proteína esencial en numerosos procesos biológicos y cuya función no puede suplirse por ninguna otra proteína celular, a diferencia de lo visto con las quinasas. Además, se ha visto que los ligandos frente a tubulina actúan también como agentes disruptores de la vascularización tumoral, precisamente debido a la funcionalidad multitarea que desarrolla esta proteína (Canela et al., 2017).

Esta clasificación es solo orientativa, ya que existe gran cantidad de dianas que pueden ser utilizadas para inhibir la proliferación celular, las que se muestran aquí son las dianas más frecuentes y que han dado mejores resultados en clínica. Otros fármacos interesantes son los que inhiben procesos como la transcripción de genes (Li et al., 2013) o el mantenimiento de los telómeros (Bryan et al., 2015), ambos procesos necesarios para el crecimiento y desarrollo tumoral. Por último, un grupo de fármacos especialmente interesante es el de los inhibidores de la angiogénesis (Junker et al., 2018), ya que la inhibición de este proceso bloquea por un lado la aportación de oxígeno al tumor, y por otro, la metástasis. Algunos fármacos pueden además tener actividad dual frente a dos dianas diferentes, siendo especialmente relevantes para este trabajo el caso de los ligandos que pueden unirse tanto a determinadas quinasas como a la tubulina (Bohnacker et al., 2017; Tanabe, 2017),

1.4. Microtúbulos como diana antitumoral

El citoesqueleto celular consiste en un entramado de proteínas formado por una serie de estructuras poliméricas que permiten diversas funciones celulares, entre las que se encuentran: el movimiento de la célula, la división celular, los procesos de señalización y el transporte intracelular. Los tres componentes principales del citoesqueleto son los microfilamentos de actina, los filamentos intermedios y los microtúbulos (Pegoraro et al., 2017). Debido a que los microtúbulos están implicados en múltiples funciones esenciales para la supervivencia y división celular, se han desarrollado múltiples agentes citotóxicos que interfieren en la dinámica de polimerización de éstos, permitiendo así, su uso como agentes quimioterapéuticos. Aunque también se ha estudiado la posible utilización de otros componentes del citoesqueleto como diana quimioterapéutica (Blain et al., 2010; Stehn et al., 2013; Trendowski, 2014), este trabajo está centrado en agentes dirigidos a microtúbulos.

1.4.1. Estructura y función de los microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros con forma de cilindro hueco constituidos por repeticiones del heterodímero de α,β -tubulina. En éste, cada monómero pesa 55 KDa y se caracterizan por presentar una alta homología de secuencia y estructura entre sí (Nogales et al., 1998a; Nogales et al., 1998b). Los heterodímeros de tubulina se asocian en uniones cabeza-cola formando protofilamentos polares que mediante interacciones laterales se cierran en un tubo de unos 25nm de diámetro. *In vivo* se ha estimado que normalmente los microtúbulos tienen 13 protofilamentos, pero *in vitro* se han visto variaciones de entre 9 y 16.

La tubulina es una GTPasa que se caracteriza por tener 3 dominios estructurales (Figura 6). El dominio N-terminal (residuos 1-205) presenta el sitio de unión del nucleótido. El dominio intermedio (residuos 206-381) contiene el bucle catalítico que participa en la hidrólisis mediante inserción en el sitio del nucleótido y ataque nucleofílico. Ambos dominios están separados por una hélice central denominada hélice H7, que además se ha visto que es clave en los cambios estructurales del monómero durante el ciclo de la GTPasa (Zhang et al., 2015). El dominio C-terminal comprende 2 hélices que quedan expuestas al medio y son punto de anclaje/interacción con diferentes MAPs (del inglés, proteínas asociadas a microtúbulo), así como la principal región donde ocurren las modificaciones posttraduccionales.

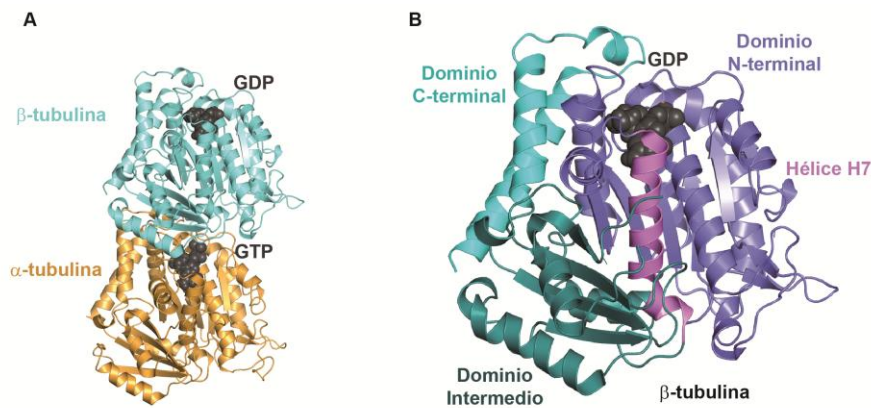


Figura 6: Estructura del dímero de tubulina. **A).** Heterodímero de α,β -tubulina (PDB:4I55). **B).** Detalle del monómero de β -tubulina mostrando las estructuras secundarias que forman parte de cada uno de los tres dominios de la proteína. El dominio N-terminal se encuentra separado del dominio intermedio por la hélice H7. El monómero de α -tubulina posee los mismos dominios estructurales.

Los microtúbulos poseen tres funciones principales en la célula. Participan en la división celular, en el transporte intracelular, y en la formación de cilios y flagelos. Según el estadio del ciclo celular en el que se encuentre la célula los microtúbulos adoptan una disposición diferente, la cual está ligada a la función que realizan en dicha etapa del ciclo (Figura 7).

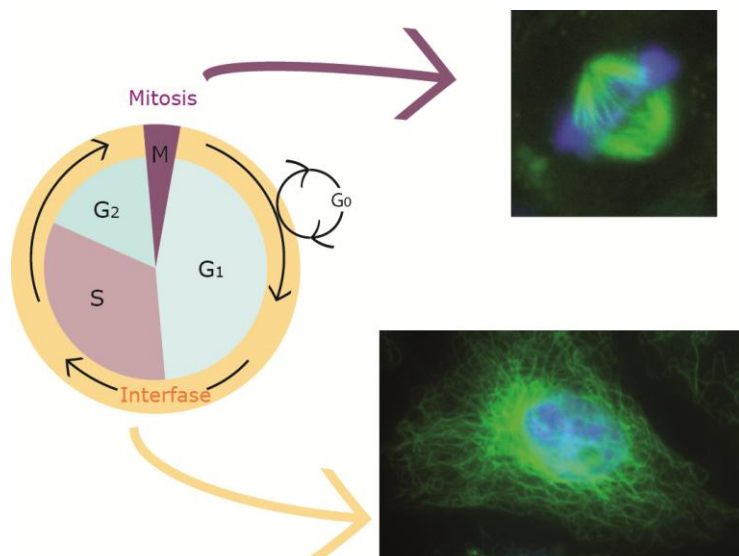


Figura 7: Esquema del ciclo celular y de la disposición de los microtúbulos en las diferentes fases. Durante la interfase se produce el crecimiento de la célula (fase G₁), la duplicación del material genético (fase S) y la preparación de las células para entrar en división (fase G₂). Algunas células se mantienen en estado quiescente (fase G₀) sin producirse en ellas los cambios necesarios para que las células progresen en el ciclo. Una vez que termina la interfase, se inicia la división celular (mitosis o fase M). Durante la interfase se forma una red que ocupa todo el citosol y durante la metafase de la división celular se forma el huso mitótico al cual se unen los cromosomas condensados. En verde se ve la tubulina mediante tinción con

FITC y en azul el ADN teñido con Hoechst 33342. Imagen adaptada de (Pera et al., 2013) y (Cortes Cabrera et al., 2016).

Durante la división celular los microtúbulos se disponen formando el huso mitótico (Figura 7), contribuyendo así a la segregación del ADN. En la metafase permiten que los cromosomas se alineen en la placa metafásica y durante la anafase es la despolimerización de los microtúbulos la que hace que el huso mitótico se vaya retrayendo, forzando así la separación de las cromátidas hermanas de cada cromosoma. Durante la interfase la distribución de los microtúbulos cambia radicalmente, extendiéndose en una red que ocupa todo el citosol (Figura 7). Esta red tiene, por un lado, función estructural contribuyendo a mantener la forma de la célula y, por otro lado, permite el transporte de vesículas y otros componentes (orgánulos, virus, complejos proteicos o ARN mensajero) en el interior de la célula. Para ello, hay proteínas motoras denominadas dineínas y quinesinas que se unen por un extremo al microtúbulo y por otro extremo al elemento a transportar (Lu and Gelfand, 2017) y emplean estos filamentos como carreteras de dirección y sentido único. Este mecanismo de transporte intracelular ocurre en todas las células pero es especialmente importante en neuronas, donde el transporte de vesículas es elevado y éstas deben recorrer todo el axón para la liberación de neurotransmisores en la región sináptica (Conde and Caceres, 2009). Por este motivo, las alteraciones en la tubulina están relacionadas con numerosas neuropatías, haciendo de esta proteína una diana para el tratamiento de estas enfermedades (Matamoros and Baas, 2016). Sin embargo, la importancia de los microtúbulos en neuronas hace también que algunos fármacos dirigidos frente a tubulina puedan presentar neurotoxicidad asociada, lo que dificulta su uso en clínica (Swain and Arezzo, 2008).

La dinámica de polimerización-despolimerización de los microtúbulos está ligada a la actividad GTPasa de tubulina. En el heterodímero existe una diferencia de secuencia clave para la funcionalidad de los microtúbulos. El residuo catalítico α Glu254 aparece mutado a Lys254 en β -tubulina impidiendo el ataque nucleofílico durante la hidrólisis de la subunidad inmediatamente inferior (Nogales et al., 1999) haciendo que el nucleótido solo pueda hidrolizarse en las subunidades β . Este pequeño cambio diferencia la nomenclatura de los dos sitios de unión de nucleótido en el heterodímero, el sitio N (del inglés no intercambiable, “non-exchangable”) en α tubulina y el sitio E (del inglés intercambiable, “exchangable”) en β tubulina. Cuando el sitio E tiene unido GTP, la tubulina es más propensa a la polimerización, y cuando se encuentra unida a GDP tiende a la despolimerización (Figura 8A). Esto hace que α -tubulina y β -tubulina formen un heterodímero estable y que el ciclo de polimerización y despolimerización este ligado al ciclo de hidrólisis del GTP en el sitio E. En el microtúbulo, la mayor parte de los dímeros se encuentran unidos a GDP, lo que favorecería la desestabilización, pero un extremo enriquecido en dímeros-GTP impide que esto ocurra.

Por tanto, los microtúbulos son filamentos polares en los que en el extremo positivo presenta subunidades β y en el extremo negativo subunidades α . En el extremo positivo se produce preferencialmente la adición los dímeros-GTP y en el extremo negativo se va produciendo de forma preferencial la liberación de dímeros-GDP, aunque en ambos extremos puede ocurrir en menor medida el proceso opuesto.

El crecimiento neto del extremo positivo viene acompañado de un acortamiento neto del extremo negativo, proceso que se conoce como acarreamiento (en inglés “treadmilling”). Una vez que un dímero-GTP se une al extremo positivo y se produce el contacto longitudinal de la subunidad α con la subunidad β subyacente, el Glu254 permite la hidrólisis del GTP en el dímero de abajo, que pasa a estar en estado GDP. De esta forma, el microtúbulo siempre tiene en su extremo positivo un conjunto de dímeros unidos a GTP y dímeros en estado transicional, unidos a GDP donde el fosfato aún no se ha liberado (GDP-Pi). Esta estructura se denomina GTP-cap y es la encargada de mantener la integridad del filamento. En determinadas ocasiones, cuando estocásticamente se pierde la estructura del cap, se produce una despolimerización rápida del microtúbulo, proceso conocido como inestabilidad dinámica (Mitchison and Kirschner, 1984). El proceso dinámico de crecimiento y acortamiento continuo permite que los microtúbulos se desplacen por el espacio celular, uniéndose a los diferentes componentes como vesículas intracelulares, proteínas de unión de microtúbulos y los cinetocoros durante la mitosis.

Otro aspecto importante es la conformación tridimensional del dímero de tubulina. Cuando la tubulina se encuentra desensamblada el dímero tiene una conformación curvada tanto si está unida a GDP como si lo está a GTP. Una vez que el dímero se añade al extremo positivo del microtúbulo, se produce una transición del estado curvado a un estado recto, en el que se facilita la formación de contactos laterales (Figura 8B) (Alushin et al., 2014; Buey et al., 2006).

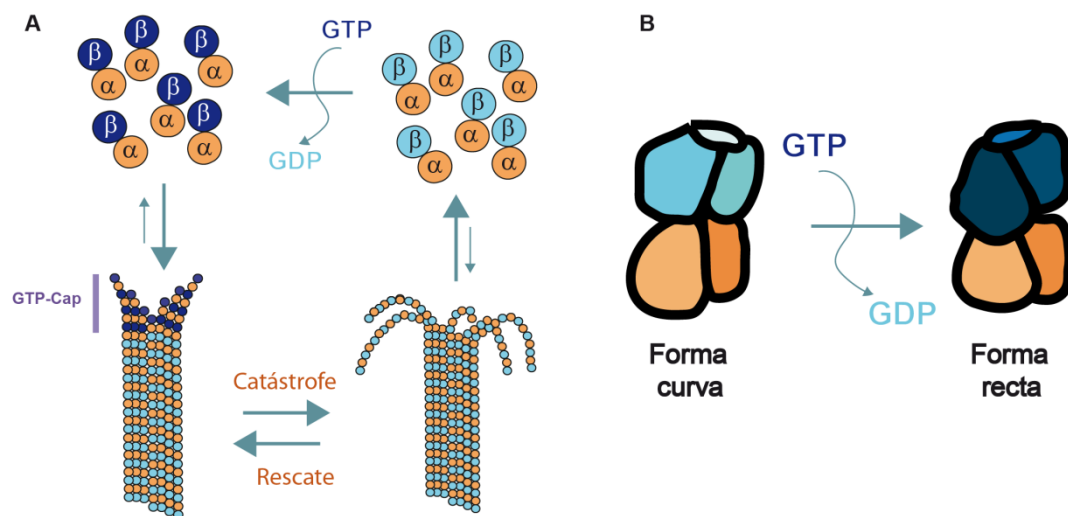


Figura 8: Dinámica de polimerización/despolimerización de la tubulina. **A)** Representación esquemática del ciclo de polimerización/despolimerización de la tubulina y del proceso de inestabilidad dinámica de los microtúbulos. La inestabilidad dinámica hace referencia al proceso reversible de polimerización (rescate) o despolimerización (catástrofe) repentina que sucede de forma estocástica. En naranja se muestran las subunidades α , en azul oscuro las subunidades β -GTP y en azul claro las subunidades β -GDP. **B)** Transición curvo-recta producida en el heterodímero de α,β -tubulina tras la hidrólisis del GTP.

1.4.2. Isotipos de tubulina presentes en los microtúbulos

Existen en varias formas isotípicas tanto de la subunidad α como de la subunidad β . Las diferentes secuencias de dichos isotipos están codificadas por una superfamilia de genes con origen evolutivo común que se ha diversificado mediante duplicaciones y mutaciones génicas (Findeisen et al., 2014). De este modo pueden existir un conjunto de diferentes heterodímeros según la combinación isotípica de las subunidades. Esta diversidad conlleva consecuencias funcionales. De hecho, la existencia de diversos isotipos dentro del microtúbulo, puede alterar ciertas propiedades dinámicas, así como la interacción con otras proteínas en el interior de la célula. Por otro lado, aunque la mayor parte de las funciones pueden ser realizadas por todos los isotipos, la distribución isotípica en los diferentes tejidos es variable, en relación a la función que realizan en cada región.

La mayor parte de los vertebrados poseen seis isotipos para la subunidad β de la tubulina, denominados $\beta I, \beta II, \beta III, \beta IV, \beta V$ y βVI . El isotipo βI aparece en casi todos los tejidos siendo el mayoritario en la mayor parte de ellos (Leandro-García et al., 2010). El isotipo βII , sin embargo, se encuentra principalmente en el sistema nervioso tanto en neuronas como en glía (Roberson et al., 1992). En primates hay dos isoformas del isotipo βII , denotadas como βIIa y βIIb aunque no hay diferencias funcionales conocidas entre ambas. El isotipo βIII se encuentra ausente en la mayor parte de tejidos, estando presente únicamente en neuronas y células de Sertoli, aunque predomina en muchos tejidos durante el desarrollo embrionario (Ludueña, 2013). El isotipo βIV se encuentra formando cilios y flagelos en todas las células que poseen dichas estructuras (espermatozoides, fotorreceptores, células ciliadas de la tráquea...) siendo ésta su principal función, aunque también se encuentra presente en otros tejidos como músculo esquelético o neuronas. El isotipo βV no se asocia a una función específica al no ser el isotipo mayoritario de ningún tejido, de hecho se expresa a niveles bajos en casi todos los tejidos. Por último, el isotipo βVI es el isotipo principal de células hematopoyéticas, estando presente en plaquetas, megacariocitos y otras células sanguíneas, aunque no es el mayoritario en linfocitos. En cuanto a los isotipos de la subunidad α , la distribución en los diferentes tejidos es menos compleja, siendo el isotipo más abundante en la mayor parte de tejidos el isotipo αI .

Desde el punto de vista clínico el isotipo βIII es especialmente importante puesto que su sobreexpresión ha sido observada en muchos tipos de tumores (Gan et al., 2010; Kamath et al., 2005; Kavallaris, 2010). De hecho, la sobreexpresión de βIII es, tras la sobreexpresión del transportador ABC de membrana gp-P, la segunda causa de resistencia a fármacos frente a tubulina (Orr et al., 2003). Además de esto, la sobreexpresión de otros isotipos ($\beta II, \beta IV$ y βV) también se ha visto relacionada con la resistencia de diversos tumores (Bhattacharya and Cabral, 2009; Gan and Kavallaris, 2008; Yang and Cabral, 2007), por lo que la determinación de las diferencias estructurales y funcionales entre los isotipos es importante de cara a obtener tratamientos más eficientes.

La dificultad de expresar isotipos específicos por técnicas de biología molecular, ha hecho que el análisis de las diferencias entre los diferentes isotipos haya sido lento. En

un primer momento se purificaron isotipos utilizando cromatografía de afinidad con anticuerpos específicos, a partir de la mezcla isotípica obtenida de cerebros bovinos (Banerjee and Luduena, 1992; Banerjee et al., 1990). Estos primeros estudios permitieron ver que la diferente composición isotípica confiere diferentes capacidades de polimerización a la tubulina. Recientemente, se ha desarrollado un método de purificación por cromatografía de afinidad para la obtención de tubulina a partir de células humanas y que produce un mayor rendimiento (Widlund et al., 2012). Esto, junto con los avances en la sobreexpresión de isotipos humanos en células de insecto (Minoura et al., 2013), ha permitido empezar a dilucidar cuáles son los mecanismos implicados en la dinámica de polimerización.

Las regiones de variabilidad de los distintos isotipos en los diferentes grupos de vertebrados se encuentran muy conservadas en la evolución (Tuszynski et al., 2006) y se agrupan en tres zonas: entre los residuos 124-129 (hélice H3 del dominio N-terminal), entre los residuos 237-240 (hélice H7 central) y en la región C-terminal (hélices de interacción con MAPS). El hecho de que las diferencias entre unos isotipos y otros se encuentren tan conservadas podría implicar la diferente funcionalidad de estos. La mayor parte de estas diferencias están en la región C-terminal, en la cual se producen el mayor número de las modificaciones postraduccionales (Magiera and Janke, 2014). Además, esta región es también una zona de contacto con otras proteínas de unión a microtúbulos, algunas de las cuales intervienen en los procesos de polimerización/despolimerización de los microtúbulos. No obstante, aunque la mayor parte de las diferencias se encuentran en el extremo C-terminal, recientemente se ha encontrado en los isotipos β II y β III evidencias de que las disparidades en las otras dos regiones la secuencia también afectan significativamente la dinámica de polimerización de la tubulina, aumentando la inestabilidad dinámica en microtúbulos formados por el isotipo β III (Pamula et al., 2016).

1.4.3. Agentes tumorales frente a microtúbulos

A día de hoy se conocen gran cantidad de compuestos dirigidos frente a tubulina (MTAs, del inglés Microtubule-targeting agents) siendo la mayor parte de ellos compuestos de origen natural o derivados sintetizados a partir de aquellos procedentes de fuentes naturales como esponjas, plantas o bacterias (Amador et al., 2003; Mukhtar et al., 2014). Debido a la capacidad que tienen de interferir en la dinámica de los microtúbulos durante la mitosis, estos compuestos pueden inhibir la formación del huso mitótico y promover la muerte celular por apoptosis. Al actuar en células en división, existe un fenómeno de afectación diferencial potenciado en células tumorales cuya división celular se encuentra más activa. Aún así, estos compuestos también actúan frente a células interfásicas inhibiendo procesos de transporte intracelular, lo cual ha permitido que sean utilizados en determinados trastornos del sistema nervioso donde el tráfico de vesículas es uno de los procesos clave en el desarrollo de dichas enfermedades (Baas, 2014; Baas and Ahmad, 2013).

Según el modo de acción de los fármacos frente a los microtúbulos, estos pueden dividirse en dos categorías: los agentes estabilizantes de microtúbulos (MSAs, del inglés Microtubule-stabilizing agents) y los agentes desestabilizantes de microtúbulos (MDAs, del inglés Microtubule-destabilizing agents) (Steinmetz and Prota, 2018). Los

primeros promueven la formación de microtúbulos, así como su estabilización mientras que los segundos favorecen la disociación de estos en dímeros de tubulina o especies oligoméricas intermedias. Los MSAs actúan fortaleciendo los contactos laterales entre protofilamentos. El principal mecanismo descrito es la estabilización del bucle M de la subunidad β -tubulina, que adquiere una estructuración helicoidal permitiendo así la potenciación de los contactos laterales entre protofilamentos vecinos (Prota et al., 2014b). Recientemente se ha propuesto un segundo mecanismo de estabilización a través del fortalecimiento de los contactos longitudinales entre dímeros (Kellogg et al., 2017). Se han descrito dos sitios de unión de MSAs, a saber, el sitio del taxol y el sitio de unión del pelurosido/laulimalida. Los segundos (MDAs), inhiben la formación de microtúbulos principalmente al impedir la transición del dímero de forma curva a recta, siendo dicha transición un cambio conformacional esencial para la incorporación del heterodímero al microtúbulo. Actualmente hay descritos cuatro sitios de unión de agentes desestabilizantes de microtúbulos, a saber, el sitio de unión a colchicina, el sitio de la vinblastina, el sitio de la maytansina y el sitio de la pironetina, estando los tres primeros localizados en la subunidad β y el cuarto en la subunidad α (Figura 9-13).

1.4.3.1. Sitio de unión del paclitaxel

La primera estructura atómica de un ligando unido a tubulina fue la del paclitaxel en 1998, que se obtuvo mediante cristalografía de electrones a partir de láminas de tubulina inducidas por zinc y estabilizadas con este compuesto (Downing and Nogales, 1998; Lowe et al., 2001). El paclitaxel se aisló por primera vez en 1962 a partir de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) y fue aprobado por la FDA para su uso como agente quimioterapéutico en 1992 bajo el nombre comercial de Taxol® (Yang and Horwitz, 2017). El sitio de unión de este compuesto en tubulina (Figura 9) está constituido por un bolsillo localizado en la cara luminal de los microtúbulos, el cual incluye principalmente residuos hidrofóbicos de la hélice H7, la lámina S7, el bucle M (bucle entre S7-H9), el bucle entre H6-H7 y las láminas S9-S10 de la subunidad β de la tubulina. Se ha descrito que el mecanismo por el cual estos ligandos producen un efecto estabilizador de los microtúbulos es mediante el plegamiento del bucle M que adquiere una estructura helicoidal, permitiendo estabilizar los contactos laterales entre protofilamentos adyacentes (Field et al., 2017).

Los compuestos dirigidos al sitio de taxol se pueden dividir en dos: aquellos que se unen de forma no covalente y aquellos que tienen un mecanismo de unión covalente. Dentro de los primeros, algunos de los más estudiados son las epotilonas (Altmann, 2003), el discodermolido (Prota et al., 2017), la dictiostatina o la sarcodictina. En cuanto a los compuestos de unión covalente, por el momento se conocen cuatro la zampanolida (Field et al., 2012), la ciclostreptina (Edler et al., 2005) y las taccalonolidas AF y AJ (Wang et al., 2017).

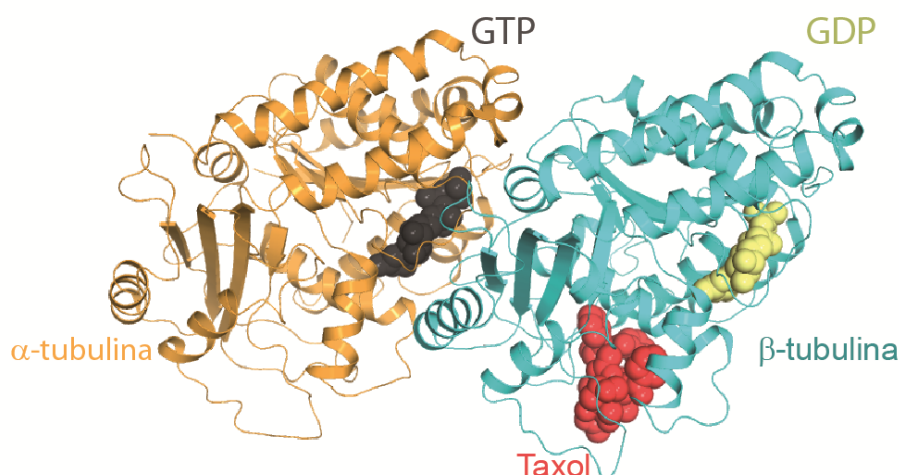


Figure 9: Estructura cristalográfica del dímero de tubulina unido a taxol. Imagen compuesta a partir de la estructura extraída del PDB 1JFF. Se muestra la subunidad α en naranja, la β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y el taxol en rojo.

1.4.3.2. Sitio de unión de colchicina

La molécula de colchicina se aisló por primera vez del azafrán salvaje (*Colchicum autumnale*) en el año 1889 (Dixon and Malden, 1908). Sin embargo, no fue hasta el año 1968, cuando se pudo determinar su diana, permitiendo así descubrir la tubulina (Borisy and Taylor, 1967), inicialmente denominada como proteína de unión a colchicina (Weisenberg et al., 1968).

El sitio de unión de colchicina (Figura 10) fue identificado en el año 2004, a partir de la estructura del compuesto N-deacetil-N-(2-mercaptoacetil)colchicina (DAMA-colchicina) unido al tetrámero de tubulina estabilizado con la proteína de unión a tubulina RB3 (Ravelli et al., 2004). El sitio de unión de la colchicina se encuentra situado en la interfase del heterodímero y desde la resolución de la primera estructura, se han resuelto múltiples estructuras de compuestos unidos a este sitio.

A pesar de que la colchicina fue aprobada por la FDA en el año 2009 para el tratamiento de la gota (Yang, 2010), no ha sido aceptado su uso en tratamientos antitumorales debido a su gran toxicidad. No obstante, la colchicina actualmente tiene usos clínicos en diversas enfermedades además de la gota, como son la fiebre familiar mediterránea (Dinarello et al., 1974; Zemer et al., 1974), ciertas dermatosis (Suehisa et al., 1983) o enfermedades cardiovasculares (Imazio et al., 2005; Nidorf et al., 2013). Hasta el momento ningún ligando del sitio de colchicina ha sido autorizado para su uso como agente quimioterapéutico en cáncer.

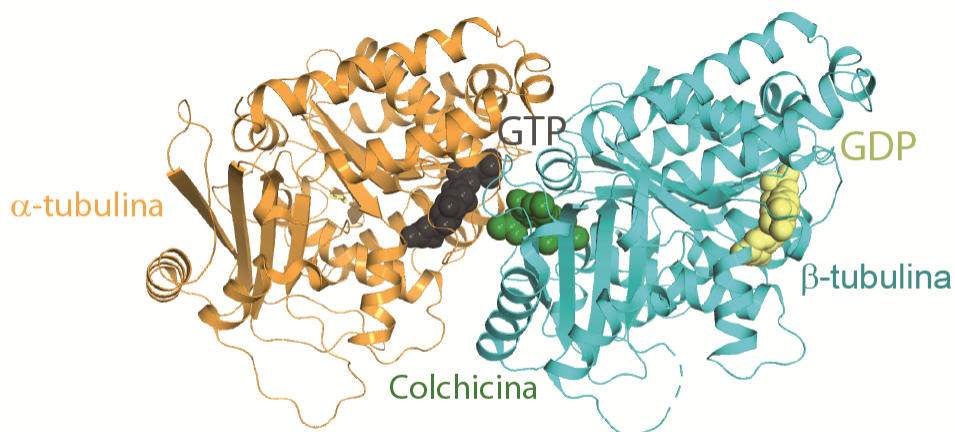


Figura 10: Estructura cristalográfica del dímero de tubulina unido a colchicina. Imagen compuesta a partir de la estructura extraída del PDB 4O2B. Se muestra subunidad α en naranja, la β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y el colchicina en verde.

1.4.3.3. Dominio Vinca o sitio de Vinblastina

Los alcaloides de Vinca fueron los primeros agentes antimitóticos extraídos de plantas en autorizarse como fármacos frente al cáncer (Noble et al., 1958). Fueron originalmente aislados de las hojas de la vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Cone et al., 1963). Actualmente cinco compuestos dirigidos a este sitio de unión están aprobados por la FDA, la vinblastina y la vincristina que fueron los primeros en aprobarse (en 1961 y 1963 respectivamente), seguidos de la vindesina, la vinorelbina y la vinflunina (Burkes et al., 2005; Ngan et al., 2000). Además de los alcaloides de vinca, se han descubierto diferentes agentes que se unen al dominio de Vinca, algunos de origen natural y otros de origen sintético, como son los péptidos dolastatina, auristatina y tubulisina (Cormier et al., 2008), la eribulina (Bai et al., 2011), las diazonamidas (Wieczorek et al., 2016) y las triazolopirimidinas (Ayrál-Kaloustian et al., 2009). El sitio de unión de la vinblastina se encuentra situado en la interfaz longitudinal entre dos dímeros adyacentes de tubulina (Figura 11) y su unión impide la incorporación de dímeros en el microtúbulo al actuar a modo de bisagra. A pesar de ello, recientemente se descubrió que un grupo de ligandos del sitio de Vinca, la triazolopirimidinas actúan como agentes estabilizadores de microtúbulos en lugar de ser desestabilizantes como el resto de los ligandos descritos para este sitio (Saez-Calvo et al., 2017).

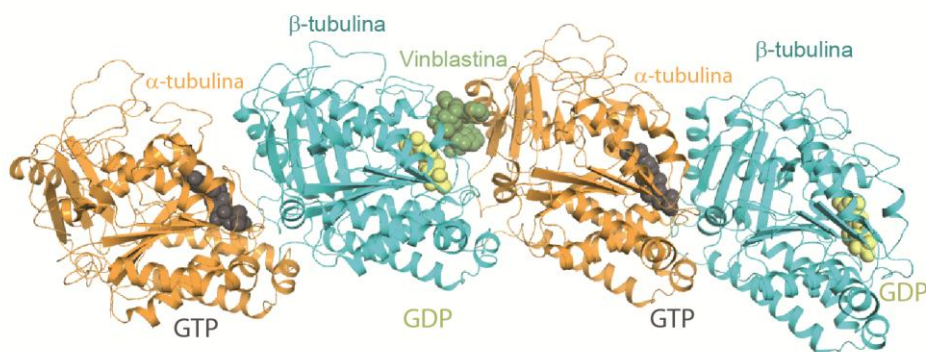


Figura 11: Estructura cristalográfica de un tetrámero de tubulina unido a vinblastina. Imagen compuesta a partir de la estructura extraída del PDB 5BMV. Se muestran las subunidades α en naranja, las β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y la vinblastina en verde.

1.4.3.4. Sitio del pelurosido/laulimalida

El pelurosido A y la laulimalida son agentes estabilizantes de microtúbulos que fueron aislados de las esponjas marinas *Cacospongia mycrofijiensis* y *Mycale hentscheli* respectivamente (Mooberry et al., 1999; West et al., 2000). Ambos poseen actividad citotóxica frente a gran cantidad de líneas celulares, permitiendo superar los principales mecanismos de resistencia a fármacos de los estabilizantes del sitio de taxol (Kanakkanthara et al., 2015). Tras su caracterización estructural mediante cristalografía de rayos X, se pudo determinar que el sitio de unión de estos ligandos es diferente al sitio de taxol (Prota et al., 2014b), encontrándose cerca de la interfaz lateral entre dos protofilamentos, en la cara externa del microtúbulo (Figura 12). Actúan de esta forma manteniendo unidos los dos protofilamentos adyacentes e impidiendo así la despolimerización. Además, la unión también favorece la estabilización de la región del bucle M, contribuyendo a potenciar los contactos laterales en el microtúbulo.

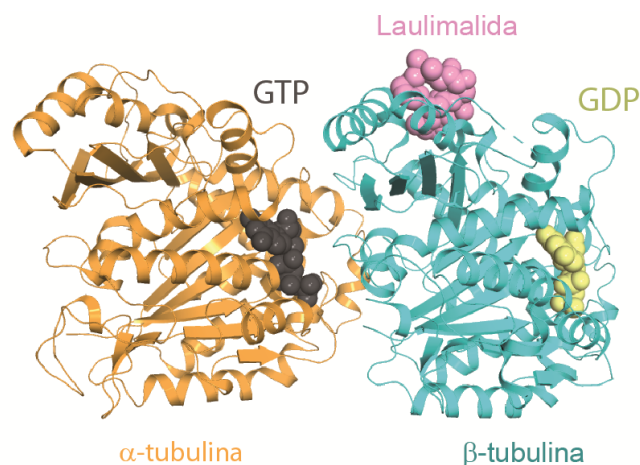


Figure 12: Estructura cristalográfica del dímero de tubulina unido a laulimalida. Imagen compuesta a partir de la estructura extraída del PDB 4O4H. Se muestran la subunidad α en naranja, la β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y la laulimalida en rosa.

1.4.3.5. Sitio de maytansina

Aunque los ligandos del sitio de unión a maytansina son conocidos desde hace bastante tiempo (Mandelbaum-Shavit et al., 1976), no fue hasta hace poco que este sitio fue descrito (Prota et al., 2014a). Hasta ese momento, se pensaba que estos ligandos podían estar uniéndose al sitio de vinblastina, ya que interferían en la interacción de esta con tubulina (Bhattacharyya and Wolff, 1977; Lin et al., 1981). Desde su caracterización inicial, se han resuelto más estructuras de diferentes compuestos como son la rizoxina, el PM060184 (Prota et al., 2014a), la espongistatina y el disorazol Z (Menchon et al., 2018). Estos ligandos se unen cerca del sitio de vinblastina, en un bolsillo expuesto de la subunidad β , interfiriendo con el ensamblaje longitudinal de los microtúbulos (Figura 13). De esta manera inhiben la formación de contactos longitudinales mediante el bloqueo de la adición de dímeros al extremo más del microtúbulo creciente. Además, se ha visto que cuando la concentración de magnesio en el medio es alta, estos compuestos pueden formar especies oligoméricas con forma de anillo (Pera et al., 2013), que a su vez también impiden la formación de microtúbulos. Actualmente, un derivado de la maytansina conjugado con un anticuerpo monoclonal está aprobado para su uso clínico en tratamiento de cáncer de mama metastático (Kadcyla™) (Lambert and Chari, 2014).

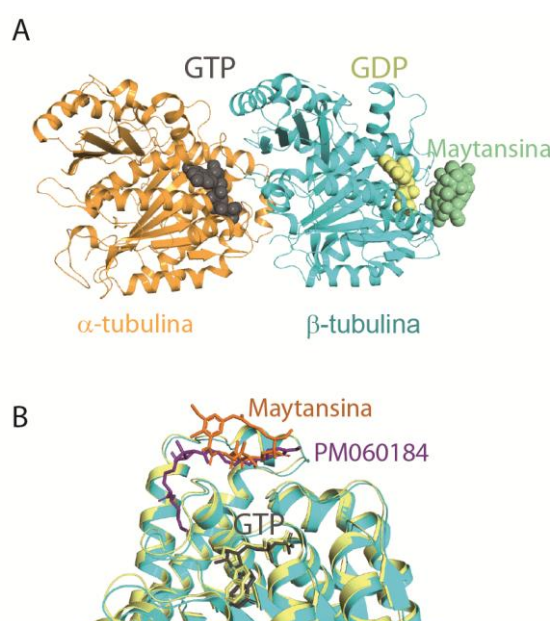


Figure 13: a). Estructura cristalográfica del dímero de tubulina unido a maytansina a partir del PDB 4TV8. Se muestran la subunidades α en naranja, la β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y la maytansina en verde. **b).** Vista en detalle del sitio de unión donde se puede observar la región de interacción de la maytansina (naranja) y del PM060184 (morado, PDB 4TV9), siendo el sitio de unión amplio y ocupando el PM060184 una región más extensa.

1.4.3.6. Sitio de pironetina

De todos los sitios de unión en la tubulina, el único descubierto hasta el momento que se encuentra en la subunidad α , es el sitio de la pironetina. La pironetina se aisló de cultivos de *Streptomyces* (Kobayashi et al., 1995) y se observó su actividad antitumoral y su efecto sobre la red microtubular (Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999), destacando por su capacidad para superar los mecanismos de resistencia a fármacos (Yoshida et al., 2007). Se propuso que la pironetina se unía de forma covalente a la Lys352 de la subunidad α (Usui et al., 2004; Watanabe et al., 2000), desestabilizando los microtúbulos al inhibir los contactos laterales (Banuelos-Hernandez et al., 2014). Sin embargo, tras obtenerse la estructura cristalográfica a alta resolución, se observó que en realidad la unión covalente se produce entre el C3 de la pironetina y el grupo tiol de la Cys316 (Figura 14) (Prota et al., 2016; Yang et al., 2016). La unión del ligando altera el bucle catalítico T7 y la hélice H8 en la subunidad α , siendo ambas zonas importantes para el establecimiento de contactos longitudinales entre protofilamentos. Desde su descubrimiento se han sintetizado análogos de la pironetina (Roldan et al., 2016), así como compuestos híbridos con compuestos del sitio de colchicina (Bonandi et al., 2019; Torijano-Gutierrez et al., 2015), con la intención de obtener moléculas capaces de unirse a este sitio y al sitio de la colchicina al mismo tiempo. Sin embargo, hasta el momento dichas aproximaciones no han generado ningún derivado que se encuentre en fases avanzadas de ensayos clínicos.

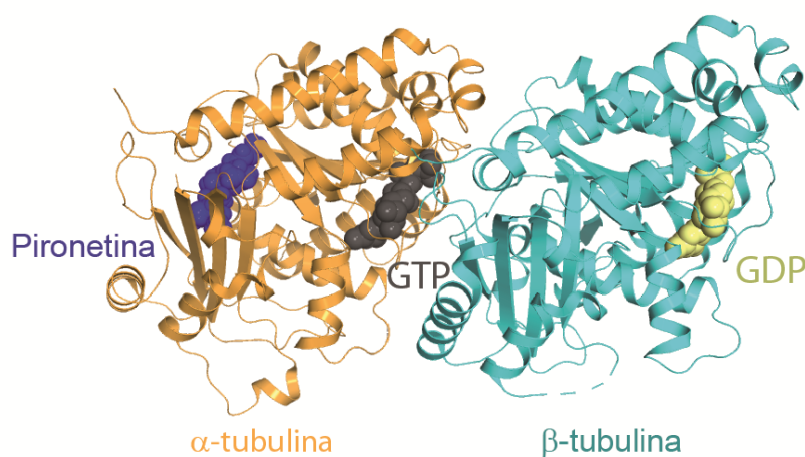


Figure 14: Estructura cristalográfica del dímero de tubulina unido a pironetina. Imagen compuesta a partir de la estructura extraída del PDB 5LA6. Se muestran la subunidad α en naranja, la β en azul, GTP en gris, GDP en amarillo y el taxol en rojo.

1.5. Mecanismos de resistencia a fármacos dirigidos frente a tubulina

A pesar de la gran cantidad de fármacos frente a tubulina que se han desarrollado, la generación de mecanismos de resistencia frente a éstos en las células tumorales sigue siendo el principal problema a la hora de obtener terapias efectivas (Kavallaris, 2010). En general, la resistencia a fármacos afecta a todos los tratamientos conocidos frente al cáncer ya que las células tumorales desarrollan múltiples estrategias que disminuyen la efectividad de los ligandos. Esto puede deberse al aumento de expresión de genes que puedan suplir la actividad de la diana afectada como ocurre en el caso de las quinasas (Engelman et al., 2007; le Coutre et al., 2000), a la generación de mutaciones en la proteína diana que disminuyan la capacidad de unión del fármaco o a la expulsión del fármaco por proteínas de membrana.

En el caso de los inhibidores de tubulina, hay descritos tres mecanismos por los que se genera resistencia a fármacos (Murray et al., 2012): la sobreexpresión de la glicoproteínas de membrana, el aumento de la expresión de isotipos secundarios de la β tubulina (ver apartado 1.4.2.) y mutaciones puntuales en el gen de la tubulina. Aunque se ha observado que las mutaciones puntuales en la tubulina afectan a la interacción de la tubulina con los ligandos, por el momento no se han encontrado evidencias de que este mecanismo de generación de resistencia sea relevante en clínica, siendo los otros dos mecanismos los que tienen mayor peso (Berrieman et al., 2004).

La sobreexpresión proteínas de membrana ABC (ATP-binding cassette) es el principal mecanismo de resistencia en la mayor parte de tratamientos tanto con compuestos que inhiben la tubulina como con otros antitumorales. Dentro de estas proteínas transportadoras, la más representativa es la P-glicoproteína (PGP) que fue descrita por primera vez en 1976. La función de estas proteínas en condiciones normales es la detoxificación mediante la retirada de compuestos dañinos que puedan entrar por el tracto gastrointestinal, especialmente durante el desarrollo embrionario (Eckford and Sharom, 2009). Debido a su sobreexpresión en células tumorales, se produce una disminución en los niveles intracelulares del fármaco haciendo inefectivos los tratamientos. La efectividad de este mecanismo de resistencia depende, por tanto, de la afinidad relativa que tiene el ligando por la tubulina y por la P-gp, pudiendo superarse dicha resistencia aumentando la afinidad del compuesto por su diana (Matesanz et al., 2008) o bien disminuyendo la afinidad el transportador, el cual tiene más afinidad por sustratos altamente hidrofóbicos (Seelig and Landwojtowicz, 2000). En este sentido, los ligandos que se unen de forma covalente a la tubulina, son los que superan mejor la resistencia por sobreexpresión de P-gp ya que, una vez producida la unión covalente, no pueden ser sustrato para la P-gp (Buey et al., 2007; Field et al., 2017)

2

Objetivos

Debido a las limitaciones de los tratamientos quimioterapéuticos, principalmente por a la aparición de tumores resistentes a fármacos, es necesario encontrar nuevos compuestos con actividad, así como mejorar el conocimiento del mecanismo de acción de compuestos ya conocidos, con objeto de generar posibles análogos mediante un diseño racional.

El presente trabajo se divide en dos partes, ambas enfocadas a mejorar el conocimiento de la tubulina como diana antitumoral. En la primera parte, se realiza un análisis bioquímico, celular y estructural de un nuevo grupo de ligandos no descritos previamente. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinar la actividad citotóxica de la serie de compuestos estudiados.
2. Estudiar la diana a nivel celular y bioquímico de los compuestos.
3. Caracterizar el mecanismo de acción de los compuestos.
4. Determinación del sitio de unión y de los residuos implicados en la misma mediante cristalografía de rayos x.
5. Analizar la interacción con la diana mediante la obtención de la estequiometría de unión y la constante de afinidad.

En la segunda parte se han utilizado compuestos covalentes dirigidos contra tubulina para estudiar el mecanismo de activación estructural ligado a la unión de fármacos al sitio de paclitaxel, así como la causa de la resistencia a quimioterapia dirigida contra tubulina:

1. Caracterizar la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica.
2. Determinar la estructura cristalográfica del complejo ciclostreptina-tubulina mediante cristalografía de rayos x.
3. Elucidar el mecanismo de reacción por el cual se une de forma covalente a la tubulina, así como los cambios generados en el sitio de unión.
4. Comparación de la unión de ciclostreptina con la de otros ligandos del sitio de taxol.
5. Determinación de su actividad en células resistentes a taxanos.

3

Materiales y Métodos

3.1. Productos químicos, tampones, ligandos y líneas celulares

3.1.1. Productos químicos

De Merck se obtuvieron: DMSO, D6-DMSO, MeOH, EtOH, DCM, fosfatos mono y di-sódico, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, NaCl, EDTA, sulfato de amonio, Tris, sacarosa, DTT, acetato de uranilo, DMF, glicerol y formaldehído.

De Sigma-Aldrich se obtuvieron: SDS, EGTA, MES, imidazol, ACN, borohidruro sódico, tritón X-100, MTT, PEG, yoduro de propidio, PIPES, HEPES, IPTG, BSA, FBS, Hoechst 33342, la ADNasa y los anticuerpos utilizados.

De Jena Bioscience se obtuvieron los nucleótidos utilizados. De GEHealthcare se obtuvieron Sephadex G25, Q Sefarosa, Superdex 75 y DEAE Sephadex A50. Los medios de cultivo y sus suplementos se obtuvieron de Gibco. La doxorubicina proviene de Calbiochem. La ARNasa A proviene de Boehringer Mannheim GmbH, ADNasa. La tripsina se obtuvo de Promega. El glutaraldehído procede de Emscope.

3.1.2. Tampones

a) Tampón PEDTA x mM GTP y x' mM MgCl_2 : 10 mM fosfato sódico (1:1 NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4), 1 mM EDTA, x mM GTP y x' mM MgCl_2 , pH7.0.

b) Tampón GAB xmM GTP: 10 mM fosfato sódico (1:1 NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4), 1mM EGTA, xmM GTP y 6 mM MgCl_2 , pH6.7.

c) Tampón NaPi 10 mM: 10 mM fosfato sódico (1:1 NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4), pH 7.0.

d) Tampón PEM: 0.1 M PIPES, 1 mM EGTA y 2 mM MgCl_2 , pH 6.8.

e) Tampón glicina: 0.13 M glicina/NaOH, 0.2M NaCl y 70% glicerol, pH 8.6.

f) Tampón PD-10: 15 mM PiPes-KOH, 0.3 mM MgCl_2 , 0.2 mM EGTA, 0.1 mM GDP, pH 6.8.

g) Tampón PBS: 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM NaH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.2.

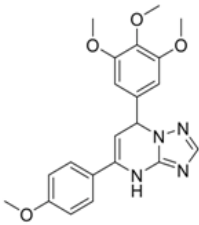
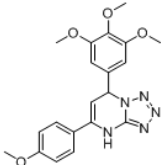
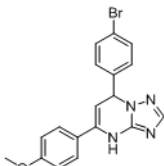
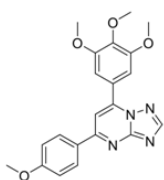
h) Tampón PMS: 10 mM NaPi, 0.5 mM MgCl_2 , 0.24M Sacarosa, pH 7.0

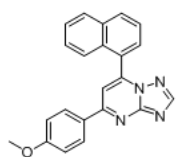
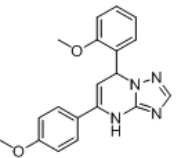
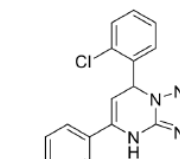
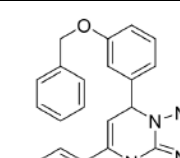
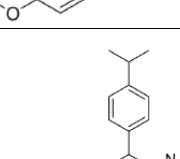
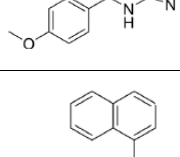
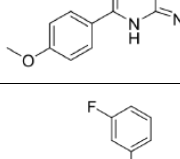
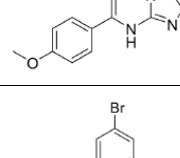
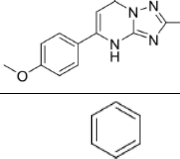
i) Tampón PMG: 10 mM NaPi, 0.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 7.0

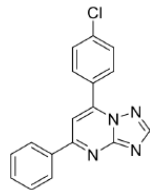
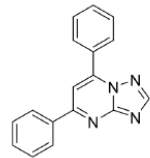
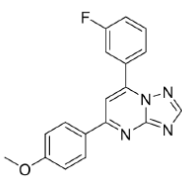
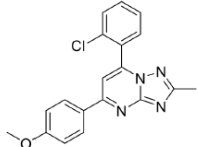
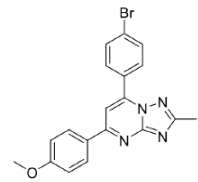
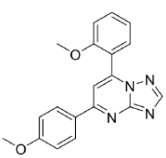
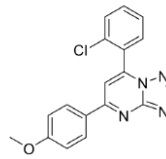
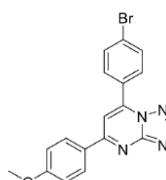
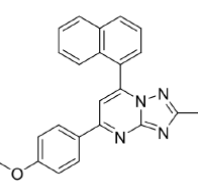
3.1.3. Ligandos

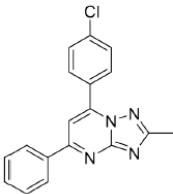
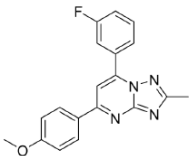
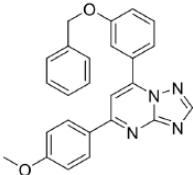
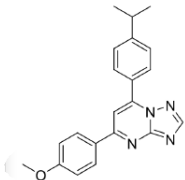
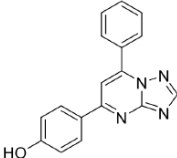
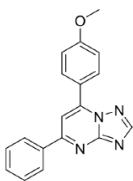
Todos los derivados utilizados en la primera parte de este trabajo proceden del Dr. Fengtian Xue de la University of Maryland School of Pharmacy (Baltimore, EE.UU). Tras la síntesis de los compuestos, fue realizado un control de calidad mediante el análisis de éstos por resonancia magnética nuclear (RMN) comprobándose que la pureza fue mayor del 95% para todos los casos. La estructura y peso molecular de los 28 compuestos se muestra en la Tabla 1. Los compuestos fueron disueltos en D6-DMSO a una concentración de 50 mM y a partir de ésta se prepararon diluciones en DMSO para su utilización en los experimentos. La nomenclatura del compuesto principal utilizado en este estudio es 5-(4-metoxifenil)-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,7-dihidro-[1,2,4]triazolo[1,5- α]pirimidina (Figura 15). De aquí en adelante se nombrará dicho compuesto como Li5.

Tabla 1: Serie de compuestos objeto de la primera parte de este estudio. Se presenta la estructura y peso molecular del compuesto principal de la serie (Li5) y todos sus derivados.

Compuesto	Peso molecular (Da)	Estructura química
Li5 (\pm)	394.43	
XH5094 (\pm)	395.419	
XH5085-3 (\pm)	383.249	
XH5032	392.42	

XH5054-5	352.397	
XH5085-1 (\pm)	334.379	
XH5085-2 (\pm)	338.8	
XH5085-4 (\pm)	410.48	
XH5085-6 (\pm)	346.43	
XH5085-5 (\pm)	354.41	
XH5085-7 (\pm)	322.24	
XH5087-1 (\pm)	397.28	
XH5037 (\pm)	274.33	

XH5038	306.75	
XH5040	272.31	
XH5054-7	320.33	
XH5067-1	350.81	
XH5067-2	395.26	
XH5054-1	332.36	
XH5054-2	336.78	
XH5054-3	381.23	
XH5067-3	366.42	

XH5067-4	320.78	
XH5067-5	334.35	
XH5054-4	408.46	
XH5054-6	344.42	
XH5059	288.31	
XH5060	302.34	

De acuerdo a la estructura de los compuestos, estos pueden dividirse en dos grupos según el estado de oxidación del anillo de pirimidina. En algunos casos dicho anillo se encuentra reducido siendo el C7 quiral (Figura 15), mientras que en otros casos el anillo de pirimidina está oxidado haciendo que el carbono C7 sea plano y no quiral.

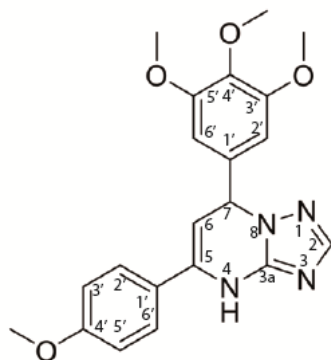


Figura 15: Estructura del Li5 (\pm): 5-(4-metoxifenil)-7-(3,4,5-trimetoxifenil)-4,7-dihidro-[1,2,4]triazolo[1,5- α]pirimidina. Se muestra la numeración de los átomos.

La ciclostreptina (Figura 16) fue donada por el Dr. Sorensen de la University of Princenton (Princenton, NJ). Fue disuelta en DMSO e inmediatamente desgasificada en atmósfera de N_2 para evitar la epoxidación e inactivación del compuesto. Los stocks nunca alcanzaron una concentración mayor de 2 mM para evitar su degradación. Para este trabajo además se han utilizado otros compuestos bien caracterizados como controles en los diferentes experimentos. El paclitaxel (Taxol®) fue donado por el Dr. Stuffness del National Cancer Institute (Bethesda, Estados Unidos). La podofilotoxina fue obtenida de Sigma-Aldrich. El docetaxel (Bissery et al. 1991) procede de Rhone Poulenc Rorer, Aventis (Schilgheim, Francia). El 7-O-[2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil]-L-alanil] paclitaxel fue sintetizado en el laboratorio del Dr. Fang del Institute of Materia Médica (Beijing, China). La pironetina fue donada por el Dr. Juan Murga de la Universidad Jaume I. La zampanolida fue cedida por el Prof. Karl-Heinz Altmann del Institute of Pharmaceutical Sciences (Zürich, Suiza). La Taccalonolida AJ fue cedida por la Dra. Susan L. Mooberry de la University of Texas Health Science Center (San Antonio, Texas, USA).

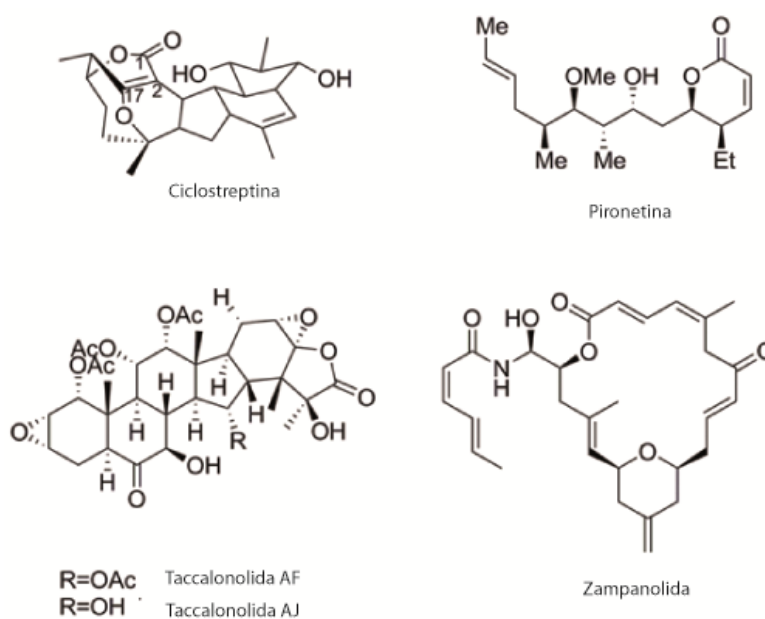


Figura 16: Estructura química de los compuestos utilizados para la segunda parte de este trabajo. Se muestra la numeración de los átomos de ciclostreptina nombrados a lo largo del texto.

3.1.4. Líneas celulares

Para este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: A549, A2780, A2780AD, HeLa S3 y HeLa β III. Las células A549 son una línea de carcinoma humano de pulmón de células no pequeñas procedente de la ATCC (American Type Culture Collection). Las células A2780 y A2780D (Huxham et al., 1994) son células de carcinoma de ovario, siendo las segundas una variante multirresistente a fármacos debido a que sobreexpresa la glicoproteína-P. Ambas líneas fueron cedidas por la Dra. Giannakaku del Weill Cornell Medical College (Nueva York, USA). Las células HeLa S3 y las HeLa β III son líneas humanas de carcinoma de cérvix siendo la segunda resistente a paclitaxel al presentar una sobreexpresión del isotipo β -III de la tubulina. Ambas fueron donadas por el Prof. Ludueña de la University of Texas (USA) (Risinger et al., 2008). Para comprobar la composición isotópica de las líneas HeLa y HeLa β -III, un precipitado de ambas fue resuspendido en tampón de carga y calentado a 60°C durante 5 minutos. Estas muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para una electroforesis SDS-PAGE. El gel fue transferido después a una membrana de PVDF utilizando el sistema Trans-Blot Turbo™ de Biorad. La membrana fue bloqueada incubándose con PBST con 6% de leche durante una hora. Se incubó dicha membrana bloqueada con el anticuerpo primario anti- β I (dilución 1/5000) o anti- β III (dilución 1/5000). Se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBST y tras esto se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario (anti-donkey IgG de conejo, ThermoFisher) durante dos horas. Tras tres lavados más de diez minutos con PBST, se revelaron las membranas usando el sistema ChemiDoc™ de Biorad.

Las líneas A549, A2780 y A2780AD fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM L-glutamina, 40 μ g/ml de gentamicina, 100 IU/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, además en el caso de las células de ovario, se cultivaron con 0.25 U/ml de insulina bovina. Las células A2780AD fueron cultivadas en presencia de doxorubicina cada cierto número de pases para mantener la sobreexpresión de la glicoproteína-P (Grosse et al., 1998). Las líneas HeLa S3 y HeLa β III se cultivaron en medio DMEN suplementado con 10% FCS, 2 mM L-glutamina, 40 μ g/ml de gentamicina, 100 IU/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. En el caso de las HeLa β III el medio fue suplementado también con 0.25 μ g/ml de fungizona y 0.5 μ g/ml de G418 sulfato para mantener la sobreexpresión del plásmido.

3.2. Proteínas

3.2.1. Purificación de tubulina

La tubulina se purificó de vacas de menos de 12 meses de edad cedidos por la ganadería Fernando Díaz y el matadero Madrid Norte SA (San Agustín de Guadalix). La purificación se realizó según lo descrito (Andreu, 2007). Se partió de 6-8 cerebros que fueron procesados en menos de 1.5 horas posteriores al sacrificio de los animales. Dicho procesamiento consistió en una retirada de las meninges y una homogeneización en tampón PBS a 4°C en frío utilizando un homogeneizador de aspas. Seguidamente se clarificó mediante centrifugación durante 35 minutos a 11000 rpm y 4°C en una centrifuga Sorvall RC-5C Plus empleando el rotor SLA3000. Este paso permite obtener un sobrenadante libre de membranas y restos celulares donde las proteínas solubles fueron sometidas a dos precipitaciones con sulfato amónico; una primera al 32%, donde la fracción precipitada se eliminó mediante centrifugación (35 minutos a 11000 rpm, y 4°C, en una centrifuga Sorvall RC-5C Plus empleando el rotor SLA3000) y una segunda, aplicada al sobrenadante de la centrifugación anterior, al 43%, que permite precipitar tubulina tras centrifugación (35 minutos a 11000 rpm y 4°C, centrifuga Sorvall RC-5C Plus, rotor SLA3000). El precipitado de tubulina fue resuspendido e incubado con una resina de intercambio iónico DEAE-Sephadex A50. Seguidamente se realizaron dos lavados con tampón PMG suplementado con 0.4M KCl y se procedió a eluir tubulina incrementando la concentración de sal a 0.8 M KCl. Este eluido se sometió a una nueva precipitación con 43% de sulfato amónico y tras clarificar mediante centrifugación, el precipitado resuspendido en tampón PMG se cargó en una columna de filtración en gel Sephadex G25. Para seleccionar las fracciones con tubulina se realizaron precipitaciones con cloruro de magnesio 35 mM. Las fracciones que contenían tubulina se juntaron y se dializaron durante aproximadamente 16h usando membranas Slide-a-lyzer (Thermo Scientific) en tampón enriquecido con un agente crioprotector (1 M sacarosa si se congela en tampón o 0.25 mM trehalosa si se liofiliza). Se determinó la concentración de la proteína purificada espectrofotométricamente, empleando diluciones 1/200 en tampón 10 mM fosfato, 1% SDS sabiendo que el coeficiente de extinción molar de tubulina en este tampón y a 275 nm es de $107000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Antes de realizar los experimentos tubulina fue descongelada o bien resuspendida en el caso de estar liofilizada y el tampón se intercambia por el tampón requerido en cada caso mediante una columna Sephadex G25 (25 cm x 0.9 cm). Las fracciones que contenían tubulina fueron juntadas y centrifugadas a 50000 rpm durante 20 minutos a 4 °C en un rotor TLA120.2 para eliminar agregados de proteína no funcional.

3.2.2. Estabilización de microtúbulos

La preparación de microtúbulos estabilizados se realizó partiendo de 30 mg de tubulina equilibrada en tampón GAB con 1 mM de GTP y 6 mM MgCl_2 . Se incubó la proteína a 37 °C durante 30 minutos para inducir el ensamblaje y formación de microtúbulos. Seguidamente se procedió a incubar diez minutos con 20 mM de glutaraldehído para estabilizar los polímeros. Para eliminar el exceso de glutaraldehído

y detener la reacción, se incubó la muestra a 4 °C con 40 mM de borohidruro sódico durante 10 minutos. En esta reacción se libera hidrógeno que genera espuma en el tubo de reacción, la cual fue recolectada en un eppendorf y eliminada dando pulsos cortos de centrifugación. La muestra con los microtúbulos estabilizados mediante enlaces entrecruzados fue dializada durante 24 horas en tampón GAB con 0.1 mM de GTP y sin magnesio. Al día siguiente la muestra se congeló gota a gota sobre nitrógeno líquido y se almacenó a -195.8 °C. Los microtúbulos estabilizados con este método pueden almacenarse durante grandes períodos de tiempo (Díaz et al., 2000).

3.2.3. Determinación de sitios de unión en microtúbulos estabilizados

Antes de utilizar los microtúbulos estabilizados se procedió a medir la cantidad de sitios de unión de estos. En primer lugar se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteína de las muestras de microtúbulos. Tras esto se prepararon muestras con 2 μ M de microtúbulos y 5 μ M de flutax-2, en presencia o ausencia de 100 μ M de docetaxel. Dichas muestras fueron incubadas 30 minutos a 25°C y centrifugadas durante 20 minutos a 50 krpm y 25 °C en un rotor TLA100 para sedimentar los microtúbulos. Se separó el sobrenadante del precipitado y éste fue resuspendido en tampón 10 mM NaPi, 0.1% SDS, pH7.0. Se hicieron diluciones de las muestras y se determinó la concentración de flutax-2 midiendo su fluorescencia usando como longitudes de onda de excitación y de emisión, 495 y 520 nm respectivamente. La diferencia entre la concentración de flutax-2 en el precipitado en ausencia y presencia de docetaxel, permite calcular la concentración de sitios totales.

3.2.4. Purificación de Tubulina Tirosina Ligasa (TTL)

Para la purificación de TTL se utilizó el plásmido NSKn1 donado por el Prof. Steinmetz del Paul Scherrer Institut (Villigen, Suiza) que contiene el gen ortólogo que codifica la TTL de pollo con una cola de 6 histidinas en la región C-terminal. Se transformaron bacterias *E.coli* BL21 (DE3) con el plásmido mediante electroporación y se crecieron a 37 °C en medio LB suplementado con 50 mg/l de kanamicina hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1.2. Tras una inducción con 1 mM de IPTG los cultivos fueron mantenidos a 20 °C durante 20 horas en agitación, tras lo cual las células fueron centrifugadas y el sedimento resuspendido en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 10% glicerol y 2.5 mM de MgCl₂) suplementado con 10 mM β -mercaptoetanol, inhibidores de proteasa (Roche), PMSF y DNAsa. Para la purificación se utilizó el protocolo descrito (Prota et al., 2013b). Las células se rompieron mediante presión en una FrenchPress y el lisado fue clarificado mediante centrifugación a 100000 g durante 45 minutos y a 4 °C para cargarse posteriormente en una columna de afinidad HisTrap de 5 mL (GE Healthcare). Tras lavar con tampón con 20 mM de imidazol, se eluyó la proteína empleando un gradiente de 20 a 250 mM de imidazol, en 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían TTL se concentraron utilizando un amicon (MWCO 30k). Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 16/60 para mejorar la pureza. El tampón utilizado para la filtración en gel fue 50 mM Bis-Tris Propano, pH 6.5, 200 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂, 5 mM β -mercaptoetanol y 1% glicerol. Se determinó la pureza de la proteína mediante

electroforesis SDS-PAGE y se concentró como se ha descrito en el paso anterior. La concentración se determinó espectrofotométricamente sabiendo que el coeficiente ε a 280 nm es de $1226 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ antes de ser alicuotada y congelada a -80°C .

3.2.5. Purificación de RB3

El plásmido que posee el gen que codifica para la proteína RB3 de rata fue donado por el Dr. Steinmetz del Paul Scherrer Institut (Villigen, Suiza). Para su purificación se transformaron bacterias E.coli BL21 (DE3) por electroporación y se sembraron en placas de selección n con $100 \mu\text{g/ml}$ con ampicilina. Se crecieron 6 litros de cultivo hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6, tras lo cual se hizo una inducción con 1 mM de IPTG durante 4 horas. Las células fueron centrifugadas y resuspendido el sedimento en tampón 20 mM Tris pH 8.0, 1 mM EGTA, 2 mM DTT suplementado con inhibidores de proteasa (Roche), PMSF y DNAsa. Las células se lisaron mediante presión con la FrenchPress y se clarificó el lisado centrifugando 15 minutos a 12000 rpm a 4°C en un rotor 45Ti. El sobrenadante resultante de dicha centrifugación fue hervido durante 10 minutos a 95°C en un baño y se volvió a centrifugar durante 1 hora a 36000 rpm a 4°C . Con el sobrenadante se realizó una cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE y la proteína RB3 se eluyó con un gradiente de 0-50% de tampón de elución (20 mM Tris, 1 mM EGTA, 2 mM DTT y 1 M NaCl, pH 8). Las fracciones donde se encontraba RB3 según electroforesis SDS-PAGE, fueron juntadas y concentradas a un volumen final de 5 ml (amicon MWCO 10k) para seguidamente llevar a cabo una filtración en gel en una columna de Superdex 75 (60 cm x 1.6 cm) equilibrada en el tampón 10 mM Hepes, pH 7.2, 150 mM NaCl y 2 mM DTT. Las fracciones que contenían proteína según electroforesis SDS-PAGE, se concentraron en amicon (MWCO 10k) y se determinó la concentración por espectrofotometría sabiendo que el coeficiente ε a 280 nm es de $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Barbier et al., 2010). La proteína fue congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -80°C .

3. 3. Ensayos de biología celular

3.3.1. Ensayos de citotoxicidad

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se sembraron células de diferentes líneas en placas de 96 pocillos a una densidad de 160000 células/ml para las líneas celulares A549 y HeLa β III, 130.000 células/ml para la línea A2780, 220.000 células/ml en la línea A2780AD y 100.000 células/ml para las células HeLa. En cada pocillo se dispensaron $80 \mu\text{l}$ de las suspensiones celulares y se incubaron 24 horas a 37°C con una atmósfera de 5% CO_2 antes de ser tratadas con diluciones seriadas de los ligandos a estudiar. Tras 48 horas de incubación en presencia de los ligandos se midió la cantidad de células viables mediante un ensayo con el agente colorimétrico MTT (Smith *et al.*, 1988) con alguna modificación. Se añadió $20 \mu\text{l}$ de MTT a 2.5 mg/ml por pocillo y se incubó durante 4 horas a 37°C , tras lo cual cada pocillo se trató con 0.1 ml por pocillo del agente solubilizante (10% SDS, 45% dimetilformamida, pH 5.5). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C para solubilizar el precipitado de

azul de formazán generado y posteriormente se procedió a medir la absorbancia a 595/690 nm en un lector de placas Appliskan (Thermo Fisher). Como blanco se usaron pocillos con medio y sin células. Para obtener el valor de CI₅₀ (concentración de ligando en la que se observa una toxicidad en el 50% de las células) se realizaron curvas logarítmicas de dosis-respuesta, atendiendo a 3 experimentos independientes para cada ligando y línea celular, por tanto, los valores se representan incluyendo el error estándar. Como controles para los ensayos del Li5 y derivados se utilizaron podofilotoxina y colchicina y para los ensayos de ciclostreptina se utilizaron taxol, pironetina y zampanolida.

3.3.2. Ciclo celular

Para determinar el efecto de los compuestos sobre el ciclo celular, se incubaron células de la línea de carcinoma de pulmón A549 en placas de 24 pocillos, a una concentración de 150.000 células/ml en volúmenes de 1 ml por pocillo. Tras incubar las células a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas se procedió a añadir diferentes concentraciones de los ligandos Li5, XH5094, XH5085-3, así como XH5032 y podofilotoxina como controles. Por otro lado, se utilizó como control células a las que se añadió DMSO equivalente al usado en los ensayos con ligandos, sin superar en ningún caso el 0.5 % v/v de DMSO. La incubación con los ligandos se realizó durante 20 horas a 37 °C, tras lo cual se tripsinizaron las células, se lavaron con PBS, se fijaron utilizando etanol 70 % v/v en agua a 4°C y se dejaron en frío toda la noche. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS suplementado con 60 µg/ml de ARNasa A (libre de ADNasa) y 50 µg/mL de yoduro de propidio, para teñir el ADN. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo Coulter Epics XL tal y como esta descrito (Andreu and Barasoain, 2001).

3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta

Para analizar el efecto de los compuestos sobre la red microtubular, los núcleos celulares y las mitosis se utilizaron células de la línea de carcinoma de pulmón A549. Se sembraron células a una densidad de 120.000 células/ml en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos de 12 mm y se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente se añadieron concentraciones crecientes de los ligandos Li5, colchicina y XH5032. Se hicieron controles de células con DMSO sin que en ningún caso se excediera de una concentración de 0.5 % (v/v). Se incubaron las células en presencia de los ligandos durante 24 horas a 37°C y al día siguiente se centrifugaron 5 minutos a 470 g para contabilizar también las células mitóticas. Las células se lavaron con el tampón estabilizante de microtúbulos PEMP (tampón PEM suplementado con 4% PEG) y se volvieron a centrifugar, tras lo cual se permeabilizaron con tampón PEMT (PEM con 0.5% de Tritón X-100) durante 90 segundos y se fijaron durante 30 minutos con tampón PEM suplementado con un 3.7% de formaldehído (de Ines et al., 1994). Tras la fijación se realizaron ocho lavados con tampón PBS manteniendo los cubreobjetos en la placa de 24 pocillos. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario monoclonal frente a α -tubulina denominado DM1A en una dilución de 1/2000 en PBS suplementado con 3% de BSA, durante una hora a 37°C. Se volvió a lavar (dos lavados de cinco minutos en agitación

con PBS) para eliminar restos de anticuerpo no unido. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario (de cabra frente inmunoglobulina de ratón marcado con FITC), a una dilución 1/100 en PBS suplementado con 3 % de BSA, durante 1 hora. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos en PBS y se procedió a incubar media hora con el marcador de ADN Hoeschst 33342 diluido 1/100 en PBS. Por último, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos y se añadió tampón de montaje (0.13 M glicina, 0.2 M NaCl, pH 8.6 en 70 % de glicerol), para sellar y conservar a -20 °C las preparaciones. La toma de imágenes se realizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan equipado con una cámara CMOS Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V2 C11440 con un objetivo de 100X. Todas las fotos fueron procesadas utilizando Adobe Photoshop CS5.

3.4. Caracterización de los compuestos

3.4.1. Espectrofotometría en el espectro ultravioleta-visible

El espectro de absorción UV/Visible de los compuestos se determinó en un espectrofotómetro de doble haz Evolution 201 (Thermo Scientific) utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico y tomando todas las medidas a 25 °C. Se determinó el coeficiente de extinción molar (ϵ) de los ligandos midiendo el espectro de absorción (de 240 a 340 nm) de las muestras a una concentración de 20 μ M en etanol de grado de espectroscopía. Por debajo de 240 nm la absorbancia fue medida mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) eliminando así la contribución del DMSO a la absorción UV/Visible mediante el solapamiento de ambas señales.

3.4.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para analizar cuantitativamente el Li5 y sus derivados se utilizó un análisis por HPLC en un cromatógrafo Agilent 1100 Series acoplado a una columna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (15 cm x 4.6 mm). El método cromatográfico utilizado para dicha separación fue isocrático en metanol 70% en agua, durante 20 minutos a un flujo de 1 ml/min.

3.4.3. Cuantificación de la ciclostreptina por espectrometría de masas

Para el análisis y cuantificación de la ciclostreptina se utilizó cromatografía líquida acoplada al espectrometría de masas (LC-MS), debido a la ausencia de absorción de la molécula en el espectro UV/Visible. Para ello se utilizó el mismo sistema de HPLC descrito en el apartado 3.4.2 pero acoplándolo a un espectrómetro de masas Agilent 6120 Quadrupole que utiliza un sistema de ionización mediante electrospray. El método cromatográfico utilizado fue un gradiente a 1 ml/min de acetonitrilo en agua de 5%-100% durante 30 minutos. Se añadió tanto al agua como al acetonitrilo un 0.04% de ácido fórmico. En el espectrómetro de masas se ajustó el

voltaje del capilar a 5000 V y se usó N₂ a 2 l/min y 300 °C como gas de secado. La presión del nebulizador fue de 20 psi y el fragmentador se fijó a 70 V. Se recogió la señal en polaridad positiva observándose el pico del ión monoprotonado de 401.2 m/z a un tiempo de retención de 3.5 min.

3.4.4. Determinación de la solubilidad

Para comprobar la solubilidad de los ligandos en medio acuoso se incubaron muestras diluidas a 50 μ M y 100 μ M en buffer NaPi durante 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron en una centrífuga Beckman Optima™ a 50000 rpm durante 20 minutos a 25 °C. Se comparó el espectro de absorción entre 240 nm y 340 nm, antes de centrifugar y del sobrenadante procedente de la centrifugación. Las muestras se midieron por duplicado. Además, para descartar precipitaciones de los ligandos por interacciones con el material de los tubos empleados se utilizaron dos tipos de tubos para la incubación, tubos de polipropileno (Eppendorf®) y tubos de policarbonato.

3.4.5. Determinación de la actividad óptica del Li5 por dicroísmo circular

Para determinar la actividad óptica del Li5 se utilizó la técnica de dicroísmo circular utilizando un espectropolarímetro Jasco J-720 con control de temperatura mediante sistema Peltier. Se preparó una muestra del ligando a una concentración de 250 μ M en etanol de grado espectroscopía y se midió el espectro de dicroísmo entre 240 nm y 340 nm a 25°C utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Cada espectro es el resultado de un promedio de 4 medidas distintas a 20 nm/min cada una tras restar el espectro del etanol.

3.5. Determinación de la unión a tubulina por espectrofluorimetría

La interacción del compuesto Li5 con tubulina se midió mediante fluorescencia en un fluorímetro Horiba Jovin Yvon Fluoromax-2, a 25°C. Para todas las medidas se utilizó una cubeta transparente de cuarzo de 1 cm de paso óptico y se fijaron las aperturas de los haces de excitación y emisión a 2 nm y 5 nm, respectivamente. Se utilizó 320 nm como longitud de onda de excitación, midiéndose el espectro de emisión de 370-550 nm.

3.6. Separación de los enantiómeros del Li5 por su actividad

Para separar las dos formas enantioméricas del Li5 se incubó 25 μ M de ligando con un exceso de tubulina (30 μ M) en tampón GAB (con 1 mM GTP) durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente se centrifugó la muestra durante 2 horas a 100000 rpm y 37 °C en una centrífuga Beckman Optima™ con un rotor TLA100. Se separó el sobrenadante del precipitado y se comprobó que toda la proteína se encontraba en éste mediante ensayo colorimétrico con el reactivo BCA (Smith et al., 1985). La forma

activa del ligando es la unida a la proteína, mientras que la que no interacciona se consideró como inactiva. Se prepararon muestras del sobrenadante y el sedimento del paso anterior y se procedió a analizarlas mediante dicróismo circular según lo descrito en el apartado 3.4.5. Paralelamente se analizaron muestras equivalentes mediante HPLC (ver apartado 3.4.2) para comprobar que la forma activa e inactiva del compuesto poseían la misma absorbancia y tiempo de retención.

3.7. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina

3.7.1. Efecto de los ligandos sobre la concentración crítica

Para estudiar el efecto de los ligandos sobre el ensamblaje de la tubulina se equilibró la proteína en tampón GAB y se incubó 25 μM de cada ligando con 20 μM de tubulina durante 30 minutos a 37°C. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizaron, además de los compuestos activos, taxol, DMSO, podofilotoxina y XH5032 como controles. Tras la incubación se centrifugaron las muestras 20 minutos a 50.000 rpm y 37 °C en una centrífuga Beckman OptimaTM con un rotor TLA100. Se separaron sobrenadantes y precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM NaPi, 0.1% SDS, pH 7.0. Sobrenadantes y precipitados se diluyeron 5 veces en dicho tampón y la concentración de proteína en cada muestra se determinó fluorométricamente en un fluorímetro Horiba Jovin Yvon Fluoromax-2, en cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm, a 25 °C, utilizando como longitudes de onda de excitación y emisión, 280 nm y 322 nm respectivamente y empleando aperturas de haz de 2 y 5 nm, respectivamente.

3.7.2. Efecto de los ligandos sobre la polimerización por turbidez

Para evaluar el efecto de los ligandos sobre la polimerización de la tubulina se realizaron ensayos en placas de 96 pocillos en volúmenes de 100 μl . Se puso 25 μM de tubulina en tampón GAB 1 mM GTP y 27.5 μM de cada compuesto por pocillo. Se monitorizó durante una hora a 37 °C midiendo absorbancia a 350 nm en un lector de placas Appliskan (Thermo Scientific). Este ensayo se repitió empleando concentraciones crecientes de cada compuesto en los diferentes pocillos. Los datos se normalizaron utilizando el valor mínimo de absorbancia. En todos los casos se utilizó DMSO como control.

Para comparar la capacidad de ensamblaje de la ciclostreptina con la de otros ligandos covalentes se prepararon muestras con 25 μM de tubulina en tampón PEDTA con 3 mM o 7 mM de MgCl_2 en DMSO (vehículo) y se les añadió 27.5 μM de zampanolida, taccalonolida AJ o ciclostreptina. El ensamblaje de tubulina se monitorizó a 37 °C mediante absorción a 350 nm según lo descrito.

3.7.3. Ensayos de microscopía electrónica (MET)

Para observar los polímeros inducidos en presencia de Li5, se incubó 20 μM de tubulina en tampón GAB en presencia de Li5 a diferentes concentraciones (1 μM y 20 μM) o de DMSO, como control. Las muestras se mantuvieron a 37 °C durante una hora, tras lo cual se les añadió glutaraldehído al 0.1 % v/v durante 5 minutos, con el objetivo de estabilizar los polímeros formados. La reacción del glutaraldehído se detuvo con 100 mM de glicina para bloquear los grupos aldehído libres y las muestras se guardaron a 4 °C hasta su uso. Se utilizaron rejillas de cobre con una malla de 400 cubiertas con Formvar y carbón (Electron Microscopy Science). Las muestras diluyeron 1/10 en agua Mili-Q y se emplearon 20 μl de cada muestra para adsorberlas en las rejillas durante 2 minutos, tras lo cual se hicieron tres lavados con agua Mili-Q y se tiñó con 10 μl de acetato de uranilo 1 % (p/v) durante 1 minuto. Se eliminó el exceso de volumen de la rejilla por absorción sobre papel Whatman™ de 3 mm y se secaron.

Las rejillas se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 a 100 kV equipado con cámara CMOS TVIPS 4k x 4k utilizando mínimas dosis (10-15e-/Å²). Todas las imágenes fueron tomadas a 50000X aumentos.

3.8. Ensayos de interacción tubulina-ligando

3.8.1. Unión del Li5 a tubulina dimérica y ensayo de desplazamiento con podofilotoxina medido por HPLC

La unión al heterodímero de tubulina se estudió en dos tampones diferentes, en NaPi 0.1 mM GTP y en PEDTA 0.1 mM GTP y 1.5 mM MgCl₂. Estos dos tampones se emplean para el estudio de la interacción de ligandos con el heterodímero de tubulina ya que por la baja concentración de MgCl₂ se impide la formación de especies oligoméricas (Pera et al., 2013).

Se incubaron muestras de 25 μM de Li5 con 25 μM de tubulina durante 30 minutos a 25°C. Para comprobar el posible desplazamiento con podofilotoxina, se incubaron paralelamente muestras con 25 μM de ligando, 25 μM de tubulina y 25 μM de podofilotoxina. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron en una centrifuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100 durante 2 horas a 100000 rpm a 25 °C. El sobrenadante (200 μl) se separó en dos fracciones (superior e inferior) de 100 μl y se comprobó que toda la proteína estaba en la fracción inferior mediante el método colorimétrico de BCA. Se añadió 10 μM de docetaxel como estándar interno a cada muestra. Las fracciones se sometieron a un proceso de extracción con tres volúmenes de diclorometano, se secaron, se resuspendieron en metanol 70 % y se midieron en el HPLC (sección 3.4.2 de este capítulo). Los valores de concentración unida y libre se corrigieron teniendo en cuenta que de los 25 μM de Li5 añadidos, solo un 50% corresponde a la forma enantiomérica activa. Es decir, en la fracción superior habrá ligando libre de ambas formas enantioméricas mientras que la parte inferior estará enriquecida en la forma activa ya que es la que contiene la proteína.

3.8.2. Unión a polímeros de tubulina y ensayo de desplazamiento con colchicina por HPLC

Para caracterizar la unión del Li5 se une a polímeros de tubulina, se realizó un ensayo de unión en tampón GAB 1 mM GTP, 6 mM MgCl_2 , donde se favorece el ensamblaje de tubulina. Para este ensayo se incubaron muestras con 25 μM Li5 y 25 μM de tubulina y muestras de 25 μM XH5032 con 25 μM de tubulina como control. Las muestras se mantuvieron 1 hora a 37 °C para inducir la polimerización, tras lo cual fueron centrifugadas a 100000 rpm, 2 horas, 37 °C, como se describe previamente en este capítulo. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en tampón NaPi 10 mM. Las muestras se procesaron como en el apartado anterior (3.8.1). Las muestras se analizaron por HPLC y se determinó la cantidad de compuesto unido al precipitado. Se corrigió el valor teniendo en cuenta que sólo un 50% del compuesto añadido se encuentra en la forma enantiomérica activa. De forma paralela, para corroborar la unión al sitio de colchicina, se realizó un ensayo de la misma forma pero con muestras que contenían 25 μM Li5 y 25 μM de colchicina.

3.8.3. Unión a microtúbulos estabilizados y ensayo de desplazamiento con colchicina/podofilotoxina por HPLC

Para comprobar si el compuesto puede unirse a microtúbulos estabilizados con glutaraldehído, se incubaron muestras con 25 μM de Li5 y 25 μM de microtúbulos estabilizados (preparados según lo descrito en el apartado 3.2.2). De forma paralela se incubaron microtúbulos estabilizados a la misma concentración con XH5032. Para comprobar el desplazamiento se incubaron muestras que además de Li5 tenían 25 μM de colchicina o 25 μM de podofilotoxina. Las muestras fueron procesadas de la misma forma que se describe en el apartado 3.8.2.

3.8.4. Ensayos de unión a dímeros y al complejo Tubulina-RB3 (T2R) por ultracentrifugación analítica (AUC)

Para los experimentos de velocidad de sedimentación, se contó con la ayuda del Servicio de Ultracentrifugación Analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid, estando a cargo de dichos ensayos el doctor Juan Román Luque-Ortega. Se utilizó una centrífuga Beckman OptimaTM XL-I que está equipada con un sistema de detección por interferencia de Rayleigh y otro de detección en el espectro ultravioleta-visible a longitudes de onda variables (Philo, 2009).

Para los experimentos se equilibró tubulina con tampón PEDTA 1.5 mM de MgCl_2 o con tampón NaPi, en ambos casos con 0.1 mM GTP. Para los ensayos con T2R, la proteína se equilibró en tampón 10 mM NaPi, 0.1 mM DTT, 1.5 mM MgCl_2 y 0.1 mM GTP, la proporción de tubulina y RB3 fue de 1:0.75 (T:R) para asegurarse de que toda la tubulina se encuentra desplazada hacia el estado tetramérico (Saez-Calvo et al., 2017). Todas las muestras se incubaron media hora a 25 °C, tras lo cual se cargaron en celdas de doble sector con ventanas de cuarzo de 1.2 cm de paso óptico y se centrifugaron a una velocidad angular de 45000 rpm en un rotor An50Ti. Durante

la centrifugación la temperatura se mantuvo a 25 °C y la muestra se detectó mediante absorción a 320 nm, de modo que el pico de absorción del ligando no solapara con el de la proteína.

Los perfiles de sedimentación varían con el tiempo de acuerdo a la ecuación de Lamm (Schuck, 2000). Mediante el ajuste de este modelo con los datos experimentales se puede obtener los coeficientes de sedimentación (S) y de difusión de todas las especies formadas (Brown et al., 2008) permitiendo conocer así los estados de oligomerización. Para el ajuste se utilizó el programa informático Sedfit que realiza el ajuste mediante una de las aproximaciones posibles de la ecuación de Lamm (Schuck and Demeler, 1999). El valor de S que se obtiene se tiene que corregir por los valores de densidad y viscosidad del medio empleado. Así, el coeficiente de sedimentación del complejo es alrededor de 6S y tras su corrección en tampón PEDTA tiene un valor descrito de 5.6S (Jourdain et al., 1997). Para corregir los datos experimentales al valor en agua a 20°C, se utilizó el programa Sednterp, obteniéndose así el valor de s_w (20, w). Mediante este análisis podemos observar los perfiles de interferencia de Rayleigh correspondientes a la interferencia de las diferentes especies oligoméricas y los perfiles de absorbancia correspondientes al ligando unido a las distintas especies. La alineación y comparación de dichos perfiles nos permite tener información de la cantidad de ligando unido a cada especie.

3.8.5. Determinación de la estequiometría de unión a microtúbulos nativos

Para determinar la estequiometría de unión del compuesto Li5 se incubaron en tampón GAB (1 mM GTP y 6 mM $MgCl_2$) muestras con 25 μM de tubulina y concentraciones crecientes de ligando (0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 60, 75 y 80 μM) a 37 °C durante 1 hora. Tras la incubación las muestras fueron procesadas como se describe en el apartado 3.8.2. De forma paralela se obtuvo la concentración de proteína en cada muestra de sobrenadante y de pellet para asegurar que más del 95% de la proteína sedimenta durante la centrifugación por la formación de microtúbulos.

3.8.6. Caracterización de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica

Para determinar la unión de la ciclostreptina a la tubulina dimérica se incubaron muestras con 20 μM de tubulina y 25 μM de ciclostreptina durante 4 horas a 25 °C en buffer PEDTA con 0.1 mM de GTP y 1.5 mM de $MgCl_2$. Se recogieron muestras a distintos tiempos (0 minutos, 30 minutos, 1h, 2h y 4h) con el objeto de determinar el tiempo necesario de reacción. Se utilizó como control una muestra con 25 μM de ciclostreptina en ausencia de tubulina para valorar la posible disminución del ligando por degradación o epoxidación. La ciclostreptina se detectó mediante HPLC-MS según lo descrito en el apartado 3.4.3. También se comprobó la ausencia de agregación de tubulina durante el tiempo de incubación mediante microscopía electrónica tal y como se describe en el apartado 3.7.3.

Con objeto de comprobar que la tubulina mantiene su actividad y capacidad de polimerización a los diferentes tiempos de incubación, se calentaron dichas muestras a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual fueron centrifugadas a 50000 rpms durante 20

minutos a 37 °C para sedimentar la proteína polimerizada. Se determinó la cantidad de proteína en el sedimento por fluorescencia, midiendo a 285 nm de excitación y 322 nm de emisión tal como se describe en el apartado 3.7.1.

3.9. Cálculo de la constante de afinidad del Li5 utilizando HPLC-AUC

Para el cálculo de la constante de afinidad del Li5 se realizó un ensayo de desplazamiento con podofilotoxina. Se incubó 10 μ M tubulina con 25 μ M de Li5 y con concentraciones crecientes de podofilotoxina (0, 10, 50, 100, 150 y 200 μ M) durante 30 minutos a 25 °C en tampón NaPi con 0.1 mM GTP, tras lo cual se centrifugaron 100000 rpm, 2 horas a 25 °C. El sobrenadante se separó en dos fracciones, la mitad superior (100 μ L) y la mitad inferior (100 μ L) del sobrenadante y se añadió 10 μ M de docetaxel a todas las muestras como estándar interno. Éstas fueron extraídas con diclorometano y analizadas por HPLC para determinar la concentración de compuesto Li5. A partir de los datos de concentración de ligando en la fracción superior e inferior, se calculó la proporción de enantiómero activo e inactivo en la fracción inferior (correspondiente a la proteína dimérica). La cantidad de ligando inactivo es la misma en ambas fracciones puesto que no se une a la proteína, mientras que la de ligando activo se ve enriquecida en la fracción inferior. Para calcular la concentración de ligando activo libre, se le restó a la cantidad de ligando en la mitad superior, la cantidad correspondiente al ligando inactivo. Para calcular la cantidad de ligando activo unido, se restó a la cantidad de ligando activo en la parte inferior, la cantidad correspondiente al ligando activo libre. Una vez que se tuvieron las concentraciones de ligando activo unido, se calculó la saturación fraccional del compuesto en cada punto. La saturación fraccional es la proporción de ligando unido respecto a la concentración de ligando total. Utilizando los valores de saturación fraccional frente a la concentración de podofilotoxina, se obtuvo una curva que permitió calcular la constante de afinidad. Para el ajuste de la curva y la obtención de la constante se utilizó el programa Equisgra v5 (Díaz and Buey, 2007). Además, se tuvo en cuenta la constante de afinidad de la podofilotoxina (Antunez-Mojica et al., 2016) y que la afinidad del Li5 debía ser mayor que la este ligando. El ajuste se realizó por el método de prueba y error, testeando diferentes constantes de afinidad del Li5 hasta conseguir un ajuste óptimo de los datos analizados.

3.10. Ensayos de cristalografía de rayos X

3.10.1. Formación del complejo T2RT y la cristalización

Para obtener las estructuras cristalográficas del Li5 y la ciclostreptina unidos a tubulina se empleó el sistema descrito (Prota et al., 2013b) que incluye 2 heterodímeros de α,β -tubulina en complejo con las proteínas RB3 y TTL (T2RT). La tubulina en tampón PD-10 se centrifugó a 50.000 rpms, 10 minutos en un rotor TLA120 para eliminar posibles agregados. Seguidamente se mezcló con las proteínas RB3 y TTL en una proporción de 2:1.3:1.2 (T:RB3:TTL). El complejo resultante se concentró hasta una concentración de 20 mg/ml usando un Amicon (MWCO 10K) y se

suplementó con 1 mM AMPPCP, 0.1 mM GDP y 10 mM DTT, para seguidamente ser congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Como la ciclostreptina se une de forma covalente, se pre-formó el aducto T2RT-ciclostreptina previo al proceso de cristalización, lo que se enfocó desde 3 aproximaciones diferentes. En primer lugar se realizó una incubación de 20 μ M de tubulina con 25 μ M de ciclostreptina utilizando tampón PEDTA 0.1 mM GTP y 1.5 mM $MgCl_2$ durante 4 horas a 25 °C. En un ensayo posterior se realizó una incubación de 20 μ M de tubulina con 80 μ M de ciclostreptina durante 4 horas a 25 °C con objeto de mejorar la ocupación en el sitio de unión. En segundo lugar se utilizó el tampón 10 mM Pipes, 1 mM EDTA, 0.1 mM GTP y 1.5 mM $MgCl_2$. En las dos aproximaciones, los aductos de ciclostreptina con tubulina dimérica fueron incubados con TTL y RB3, concentrados y congelados tal como se ha descrito. En tercer lugar se incubó 20 μ M de tubulina en tampón GAB, 30 minutos a 37°C con objeto de ensamblar tubulina y formar microtúbulos. Éstos se incubaron con 80 μ M de ciclostreptina durante 3 horas a 37 °C y seguidamente se desensamblaron incubando la muestra a 4 °C en presencia de 4.5 mM de EDTA y 2 mg/ml de RB3. El aducto resultante se incubó con TTL para consensuar el ratio de T: RB3: TTL, concentrado y congelado tal como se describe para el complejo T2RT.

Para determinar las condiciones exactas de formación de cristales del complejo unido a ciclostreptina, se realizó un barrido inicial de condiciones tomando como referencia 0.1 M Imidazol/MES pH 6.7, 30 mM $MgCl_2$, 30 mM $CaCl_2$, 5 mM L-tirosina y variando las concentraciones de PEG4000 (0-7 %) y de glicerol (0-11 %). Para ello se utilizó el método de difusión de vapor por gota sentada usando 200 μ l como solución precipitante en el reservorio. Las placas se mantuvieron a 20 °C y la aparición de cristales se determinó mediante observación al microscopio. Aquellas condiciones que generaban los mejores cristales por evaluación visual se optimizaron mediante el método de difusión de vapor en gota colgante utilizando 500 μ l de volumen en el reservorio. Tanto para el método de difusión por gota sentada como para el de gota colgante se utilizó una proporción de 1 μ l de complejo y 1 μ l de solución precipitante. El cristal que generó la estructura presentada se creció en 6 % glicerol y 3 % PEG4000.

En el caso del Li5, los cristales del complejo T2RT se obtuvieron realizando el mismo barrido que en el caso del complejo unido a ciclostreptina y las mejores condiciones se utilizaron para generar cristales mediante el método de difusión de vapor en gota colgante tal como se describe arriba. Los cristales crecieron durante 24-48 horas y tras esto se sumergieron en una solución de reservorio con 5 mM de Li5 durante 24 horas, previo a la crioprotección y pescado de los cristales. El cristal que generó la estructura presentada creció con 6.4% de glicerol y 4% de PEG4000.

3.10.2. Recogida de datos y procesamiento

Los cristales se difractaron en el sincrotrón (SLS-Suiza o ESRF-Francia) para lo que se congelaron en nitrógeno líquido con el fin de minimizar los daños por radiación. Dada la fragilidad de los mismos, los cristales se sometieron a un paso

previo de criopreservación empleando 2 gotas de solución madre suplementada con 1 mM AMPCPP, 10 mM DTT y 0.1 mM GDP y concentraciones crecientes de glicerol (16 y 20 %). Tanto la criopreservación como la extracción del cristal de la gota se realizó bajo microscopio, empleando lazos de nylon de diámetro variable (Figura 17).

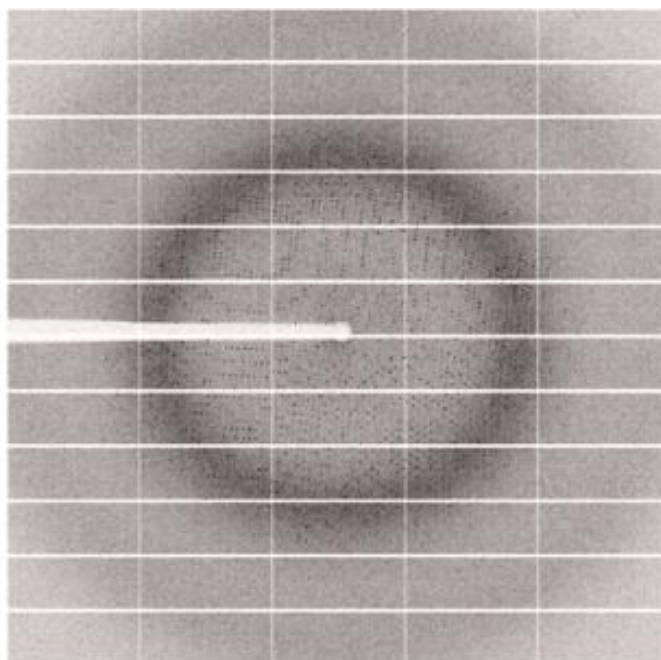
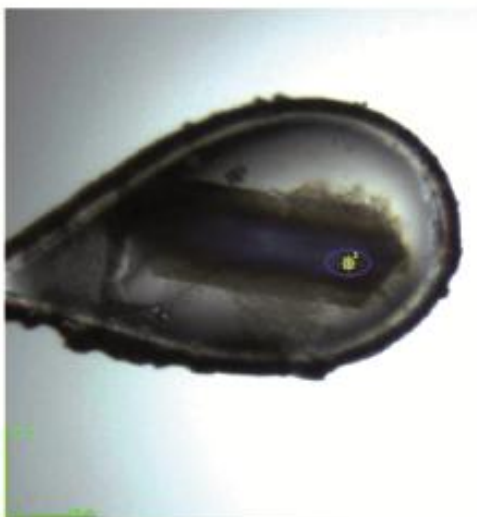
Los cristales T2RT-ciclostreptina obtenidos con los diferentes aductos fueron recogidos en las estaciones X10SA y X06DA del Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Suiza). La mejor resolución se obtuvo en un cristal procedente del aducto obtenido con 25 μ M de tubulina y 80 μ M ciclostreptina, el cual fue cristalizado con una concentración del 6 % de glicerol y 3 % PEG4000 (Figura 17B). Los cristales T2RT-Li5 se difractaron en la estación ID29 del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Francia) utilizando el detector Dectris PILATUS 6M-F. La estructura presentada proviene de un cristal crecido en 4 % PEG100K y 6.4 % glicerol (Figura 17A). Se recogieron 224 $^{\circ}$ con un incremento de phi de 0.05 $^{\circ}$, empleando 0.037 segundos de exposición y una transmisión del 5.8 % a una longitud de onda de 0.976 Å.

El procesamiento de datos de cristalografía consiste en la determinación de la intensidad e índice de Miller de cada reflexión a partir de una colección de imágenes de difracción y se divide en varios pasos. El indexado (asignación de reflexiones a cada punto de difracción, cálculo de la celda unidad y la simetría), la integración (medida de las intensidades de las reflexiones listadas y optimización de parámetros de geometría y propiedades del cristal), el escalado y el promediado de la intensidad de todas las reflexiones relacionadas por simetría. Esta parte inicial fue realizada con la ayuda de los Dr. Andrea Prota (ciclostreptina) y M^a Ángela Oliva (Li5) empleando los programas XDS (Kabsch, 2010) y AIMLESS (Evans and Murshudov, 2013) implementado dentro de la suite CCP4. Los cristales del complejo T2RT pertenecen al grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁. Para la resolución de la estructura se empleó el método de reemplazamiento molecular, en el que se emplean las fases conocidas de un cristal homólogo para resolver las fases desconocidas del cristal con el que trabajamos. Se empleó el programa PHASER (Storoni et al., 2004) y las estructuras con código PDB 4O2B, para la estructura de T2RT-Li5, y PBD 5LXT para la estructura T2RT-Ciclostreptina. Una vez obtenido el modelo correctamente orientado y posicionado por reemplazo, comienza el proceso de construcción del modelo atómico de la nueva estructura mediante refinamiento. Éste es un procedimiento matemático en el que se optimizan los parámetros del modelo de acuerdo con los datos experimentales. Para ello, se calculan los mapas de densidad electrónica a partir de los factores de estructura observados experimentalmente y los parámetros del modelo (posiciones atómicas (x,y,z) y factores B). Éstos revelan aquellas regiones donde el modelo inicial no representa correctamente la nueva estructura y que deben ser modificadas. La corrección sistemática de todos los errores supone alternancia entre fase de construcción (COOT, (Emsley and Cowtan, 2004)) y fase de refinamiento (PHENIX, (Adams et al., 2010)) en un proceso iterativo. Para la optimización se aplica una función matemática al conjunto de parámetros a refinar de máxima verosimilitud (*maximun likelihood*). Los parámetros empleados durante el refinamiento variaron de las primeras etapas tras el reemplazo molecular a las últimas. En cada uno de los ciclos de refinamiento se busca minimizar las diferencias entre los factores estructurales calculados a partir del modelo y los obtenidos experimentalmente. Estas

diferencias se conceptualizan en los factores R (R_w y R_f , obtenido a partir de un 5% de los datos experimentales) que se emplean para evitar introducir sesgos durante el refinamiento y construcción del modelo. El modelo cristalográfico se completó con la adición de ligandos, moléculas de agua, iones y otros componentes presentes en el tampón de cristalización. Una vez finalizado el refinamiento, se validaron las estructuras mediante el programa MolProbity (Chen et al., 2010), en el que se analiza exhaustivamente las características geométricas y esteroquímicas de la estructura. Los datos correspondientes a cada uno de los cristales analizados se resumen en la Tabla 2.

Todas las figuras fueron preparadas utilizando el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, v2.0, Schödinger LLC, New York, 2017).

A



B

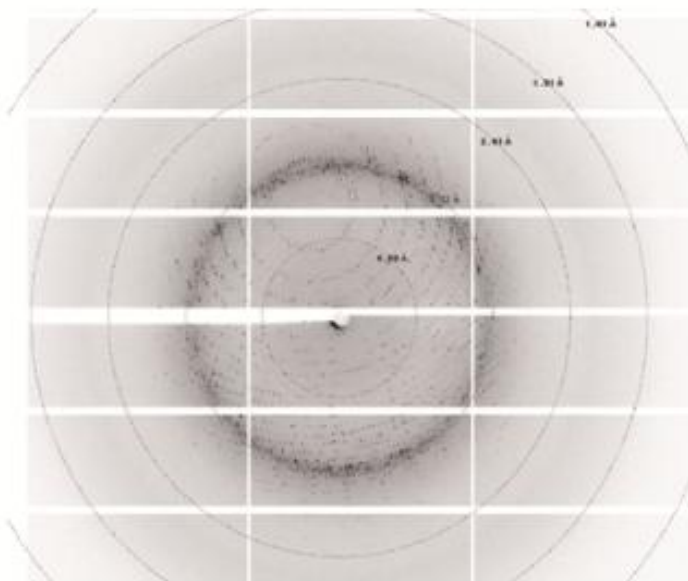


Figura 17: **A)** Cristal utilizado para la recolección de datos y difractograma a partir del cuales se determinó la estructura del complejo T2RT-Li5. **B)** Cristal utilizado para la recolección de datos y difractograma a partir del cual se determinó la estructura del complejo T2RT-Ciclostreptina.

	T2R-TTL-Li5	T2R-TTL-Ciclostreptina PDB: 6QTN
Recogida de datos		
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Celda unidad		
<i>a, b, c</i> (Å)	104.6, 156.72, 179.95	104.6, 158.4, 179.95
Resolución (Å)	47.84 – 2.40 (2.44-2.40)	49.7 – 1.9 (1.95-1.90)
<i>R</i> _{merge} (%)	58 (866)	10.2 (448.5)
<i>R</i> _{meas} (%)	63 (937)	10.4 (457.2)
<i>R</i> _{pim} (%)	24 (354)	2.5 (84.3)
<i>I</i> / σI	18.5 (2.2)	22.7 (0.9)
CC 1/2	99.9 (77.4)	100 (32.2)
Compleitud (%)	100 (100)	100 (100)
Redundancia	6.9 (6.9)	26.8 (27.0)
Refinamiento		
Resolución (Å)	47.845 – 2.4	49.7 – 1.9
Nº Reflexiones únicas	166904	234314
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	20.36 / 24.60	18.7 / 21.3
Nº Átomos		
Proteína	17044	17404
Ligando	237	58
Agua	83	681
Promedio de <i>B</i> -factors (Å ²)		
Proteína	61.6	62.3
Ligando	63.4	85.1 / 91.5
Agua	49.1	55.7
Wilson <i>B</i> -factor	53.18	42.4
R.m.s.d		
Longitud de enlaces (Å)	0.003	0.004
Ángulo de enlaces (°)	0.553	0.652
Estadísticas Ramachandran ^c		
Regiones favorables (%)	96.83	98.0
Regiones permitidas (%)	3.17	2.0
Outliers (%)	0	0

Tabla 2: Parámetros estadísticos de la recogida de datos y refinamiento de las estructuras cristalográficas de los complejos T2RT-Li5 y T2RT-Ciclostreptina.

3.11. Análisis de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica por espectrometría de masas (MS)

Para confirmar el residuo de unión observado en el complejo cristalográfico, se procedió a analizar el aducto tubulina-ciclostreptina por espectrometría de masas. Para ello se usaron las condiciones del cristal de mayor resolución, incubándose 20 μ M de tubulina con 80 μ M de ciclostreptina. El análisis de las muestras fue realizado por el Dr. Enrique Calvo en el servicio de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. Como control se procesaron muestras con 20 μ M de tubulina en ausencia de ciclostreptina. Las muestras fueron digeridas durante toda la noche a 37 °C con tripsina porcina en una relación de 1:50 (tripsina:proteína), tras lo cual se secaron en condiciones de vacío y se disolvieron en 1 % de ácido acético para su análisis en el LC-MS. Las muestras peptídicas se inyectaron en una nano-columna de fase reversa C-18 (75 μ m I.D. y 50cm, Acclaim PepMap, Thermo Fisher) y se analizaron con un gradiente de 0-40% (H₂O/acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico) durante 120 minutos y 50-100% durante 1 minuto. Se mantuvo un flujo de 200nL/min para eluir los péptidos que se ionizaron y fragmentaron utilizando un espectrómetro de masas Q Exactive HF (Thermo). Se realizó un escaneo y se seleccionaron y analizaron los 15 espectros de fragmentación más intensos estableciendo una exclusión dinámica de 30 segundos. Para la identificación del residuo se extrajeron los espectros de masas utilizando el software Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Fisher Scientific) y se analizaron usando el software SEQUESTTM (Thermo Fisher Scientific).

3.12. Análisis bioinformático

Para cuantificar la contribución de las interacciones del Li5 observadas por cristalografía a lo largo del tiempo, se realizó una simulación de dinámica molecular. Además, dada la ausencia de estructuras cristalográficas para los otros dos ligandos activos de la serie (XH5094 y XH5085-3) se procedió a realizar un estudio de acoplamiento molecular con tubulina, para predecir si la forma de unión es la misma que la del Li5.

3.12.1. Análisis de la interacción Li5-tubulina mediante dinámica molecular

El análisis de las interacciones del complejo Li5 con T2RT fue realizado mediante dinámica molecular utilizando el software Desmond versión 4.4 (Desmond Molecular Dynamics System, D.E. Shaw Research, New York, NY) y mediante el uso del programa Maestro 10.4.017 (Maestro Schrödinger, LLC, New York, NY) como interfaz gráfica. Se utilizó para el cálculo un procesador Intel Core i7-4770 CPU @ 3.50GHz x 8 y una tarjeta gráfica GeForce GT 630/PCIe/SSE2. El complejo T2RT-Li5 se colocó en una caja ortorrómbica de agua utilizando el modelo de aguas TIP3P y utilizando como campo de fuerzas el OPLS_2005. Durante la simulación se utilizó el modelo NPT que mantiene la temperatura (300 K) y la presión (1.01325 bar) constantes. Se añadieron iones durante la simulación mediante la adición de 0.15 M de NaCl al modelo. Se obtuvo así una trayectoria de 5ns que fue analizada mediante la herramienta SID (del inglés, Simulation Interaction Diagram) integrada en Maestro.

3.12.2. Análisis de la interacción de los compuestos XH5094 y XH5085-3 mediante acoplamiento molecular

Para la realización de los estudios de acoplamiento molecular ("docking") de los análogos activos del Li5 (XH5094 y XH5085-3) frente al dímero de tubulina, se utilizó el programa AutoDock 4.2.6 (Morris et al., 2009). Se utilizó el Li5 como control para validar el modelo realizando el acoplamiento molecular con la estructura cristalográfica obtenida. Una vez comprobado que el resultado del acoplamiento coincidía con el resultado obtenido por cristalografía, se procedió a utilizar los mismos parámetros para realizar el acoplamiento del dímero frente a la forma enantioméricas R del Li5, el XH5032, el XH5094 y el XH5085-3. Para generar los archivos con la estructura tridimensional de los diferentes ligandos se utilizó el programa Maestro.

Para preparar los archivos de entrada se utilizó la interfaz gráfica AutoDock Tools 4.2 de AutoDock 4.2.6. En primer lugar se preparó la proteína eliminando uno de los dímeros, la molécula de TTL y la de RB3 para simplificar los cálculos. Se eliminaron también todas las moléculas de agua de la estructura y se añadieron tanto los hidrógenos como las cargas. Una vez se tuvo el dímero de tubulina preparado, se prepararon los ligandos añadiéndoles las cargas y localizando el centro de la molécula y los ejes de torsión. La rejilla utilizada durante el acoplamiento se centró en el sitio de unión del Li5 y se mantuvo la estructura de la proteína rígida. El tamaño de la rejilla utilizado fue de 60x60x60 y el algoritmo utilizado para el acoplamiento fue un algoritmo genético. Se realizaron 250 iteraciones y una vez finalizado el proceso las poses fueron agrupadas en grupos según su conformación y su energía de unión.

Resultados

4.1. Caracterización del Li5 y derivados

4.1.1. Cribado de los compuestos

Los compuestos recibidos se cribaron por su toxicidad con el fin de seleccionar aquellos activos. Para ello se utilizó la línea celular A549 y se midió la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de todos los ligandos. Se realizaron tres experimentos y se utilizaron como controles colchicina y podofilotoxina, cuyo valor de CI_{50} en esta línea ha sido descrito previamente (Antunez-Mojica et al., 2016).

Compuesto	CI_{50} (μM)
Colchicina	0.051 ± 0.01
Podofilotoxina	0.078 ± 0.009
Li5 (\pm)	0.018 ± 0.001
XH5094(\pm)	0.266 ± 0.034
XH5085-3(\pm)	0.952 ± 0.048
XH5032	19 ± 2
XH5054-5	54 ± 13
XH5085-1(\pm)	45 ± 7
XH5085-2(\pm)	33.3 ± 10.8
XH5085-4(\pm)	38.1 ± 3.4
XH5085-6(\pm)	38.3 ± 4.9
Xh5085-5(\pm)	34.4 ± 4.4
XH5085-7(\pm)	78.8 ± 0.5
XH5087-1(\pm)	52.5 ± 4.3
XH5037(\pm)	42.7 ± 2.7
XH5038	18.4 ± 6.5
XH5040	47.9 ± 1.5
XH5054-7	49.4 ± 0.05
XH5067-1	46.6 ± 2.2
XH5067-2	41.9 ± 0.5
XH5054-1	35 ± 4
XH5054-2	49.9 ± 1.8
XH5054-3	59.6 ± 7.8
XH5067-3	50.3 ± 0.2
XH5067-4	47.9 ± 0.6

XH5067-5	46.6 ± 1.15
XH5054-4	>100
XH5059	47.4 ± 2.4
XH5060	93 ± 1

Tabla 3: Citotoxicidad de todos los compuestos objeto de estudio en la línea A549. Se muestra la media ± el error estándar de tres experimentos.

Como se puede observar en la tabla, de todos los ligandos de la serie, solo tres de ellos presentan actividad citotóxica en el orden submicromolar, siendo uno de ellos el compuesto parental Li5. El segundo más activo (200 nM) es el XH5094 cuya estructura es bastante parecida a la del compuesto Li5, difiriendo en la presencia de un nitrógeno en la posición 3 del anillo triazolo. El tercer compuesto activo es el XH5085-3, el cual tiene una actividad cercana a 1 μ M (952 nM) aunque en este caso la estructura difiere bastante más con respecto al Li5, al carecer de uno de los tres grupos metoxi del grupo trimetoxifenil, habiendo un grupo bromo sustituyendo al trimetoxi central. A partir de este punto se centró el estudio en los tres compuestos activos, especialmente en el Li5 al ser el de mayor actividad (18 nM). Se escogió el XH5032 para ser utilizado como control negativo al ser el compuesto inactivo con mayor similitud estructural al Li5.

4.1.2. Análisis de las propiedades biofísicas de los compuestos activos

Una vez conocida la actividad citotóxica en la línea A549, se caracterizaron biofísicamente mediante la determinación para cada compuesto de los coeficientes de extinción molar, así como la solubilidad en tampón acuoso. También se determinó el mejor método para separarlos y cuantificarlos por cromatografía líquida de alta eficacia.

4.1.2.1. Cálculo del coeficiente de extinción molar

Para poder medir la cantidad de compuesto por espectrofotometría en los sucesivos experimentos, se determinaron los parámetros espectroscópicos de cada uno a través de los espectros de absorción en la zona del ultravioleta-visible. Se calcularon así los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los ligandos.

Al medir los espectros de absorbancia de los compuestos en etanol absoluto (Figura 18), se vio que los tres compuestos activos presentan un máximo de absorción en torno a 250 nm con un hombro alrededor de 280-300 nm, mientras que la forma oxidada inactiva (XH5032) presenta un máximo a 330 nm (Tabla 4)

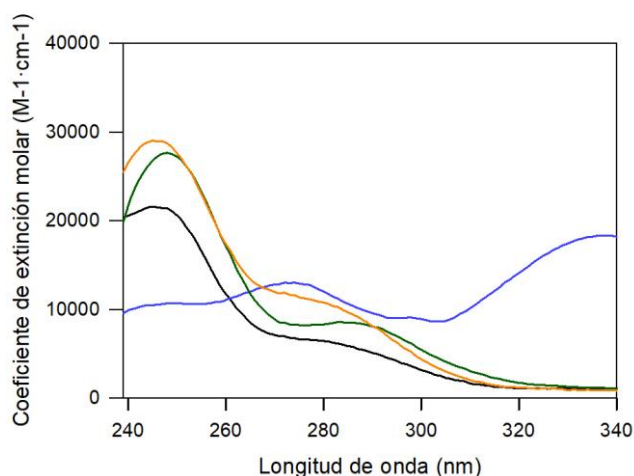


Figura 18: Espectros de absorción en la región ultravioleta-visible de los compuestos utilizados en este trabajo: Li5 (negro), XH45032 (azul), XH5085-3 (verde) y XH5094 (naranja).

Compuesto	Coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)
Li5 (\pm)	21522 \pm 400	250
XH5085-3 (\pm)	27660 \pm 200	250
XH5094 (\pm)	27434 \pm 700	250
XH5032	18605 \pm 100	320

Tabla 4: Coeficientes de extinción molar de los compuestos estudiados en unidades $M^{-1}cm^{-1}$ con sus respectivos máximos de absorción medidos en etanol. Se representan los valores medios de tres muestras (\pm) error estándar.

4.1.2.2. Determinación de la solubilidad

Debido a que todos los experimentos se realizan en medio acuoso se analizaron los espectros de absorción en tampón fosfato 10 mM y se calculó la solubilidad de cada compuesto en dicho medio. Se midió la pérdida de solubilidad tras incubar y centrifugar muestras que contenían los compuestos concentraciones altas (50 μM). Al medir espectrofotométricamente antes de centrifugar, se obtiene el perfil de absorción en tampón acuoso, en dicho perfil podemos ver que los compuestos tienen un pico de absorbancia a 330 nm (Figura 19), además del pico a 240 nm determinado en etanol (Figura 18, apartado 4.1.2.1). La comparación de los perfiles de absorbancia antes y después de centrifugar, mostraron que el compuesto Li5 era más soluble (90 μM) mientras que el compuesto XH5085-3 fue el que presentó una solubilidad más baja (10 μM , Tabla 5).

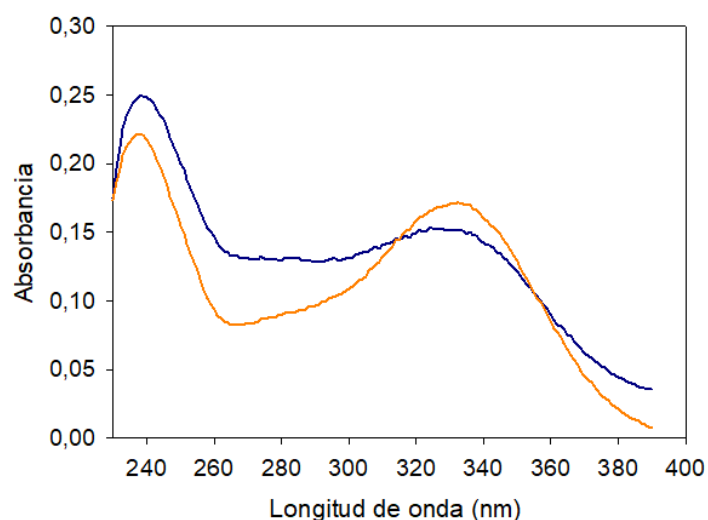


Figura 19: Espectros de absorción del Li5 a 50 μM en tampón 10 mM NaPi antes de centrifugar (azul) y tras centrifugar (naranja).

Compuesto	Límite de solubilidad (μM)
Li5 (\pm)	90
XH5085-3 (\pm)	10
XH5094 (\pm)	60
XH5032	60

Tabla 5: Valores de los límites de solubilidad en tampón 10 mM NaPi de los compuestos utilizados en este estudio.

4.1.2.3. Identificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para poder cuantificar la cantidad de cada ligando en los sucesivos experimentos, se desarrolló un método de separación en columna de fase reversa C18 por HPLC. Utilizando como fase móvil 70 % de metanol en agua se pudieron separar todos los compuestos y en ninguno de los casos el pico de absorbancia coincide con el del docetaxel, permitiendo usarlo como estándar interno (Figura 20). En la Tabla 6 se muestran los tiempos de retención de cada uno de los compuestos.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	λ_{abs} (nm)
Li5 (\pm)	4.7	260
XH5094 (\pm)	3.9	260
XH5085-3 (\pm)	8.2	260
XH5032	5.3	320
Docetaxel	11.7	260

Tabla 6: Tiempos de retención de los compuestos utilizados en este trabajo y longitudes de onda a las que se monitoriza la absorbancia.

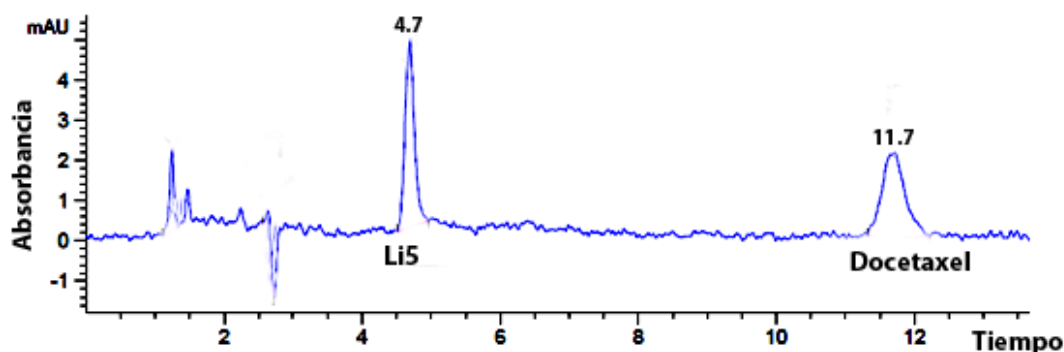


Figura 20: Cromatograma de muestra de una carrera con 15 μM de Li5 y 15 μM de docetaxel donde se muestra el tiempo de retención de ambos picos.

4.1.3. Efecto de los ligandos a nivel celular

4.1.3.1. Citotoxicidad en células resistentes por sobreexpresión de P-gp

Una vez conocida la CI50 en la línea A549, se determinó la citotoxicidad de los compuestos activos en las líneas de carcinoma de ovario A2780 y A2780AD (la cual presenta sobreexpresión de la glicoproteína-P de membrana). La comparación de los valores de CI50 entre ambas líneas mediante el índice R/S permite obtener información acerca de cómo de bueno es un fármaco superando los mecanismos de resistencia a quimioterapia por sobreexpresión de transportadores de membrana. El compuesto Li5 presenta una citotoxicidad parecida a otros compuestos del sitio de colchicina (colchicina y podofilotoxina) en A2780, mientras que los otros compuestos activos estudiados presentan una toxicidad menor. Los valores de los compuestos activos se correlacionan con los obtenidos en la línea A549, siendo el menos activo de los tres el XH5085-3 con un valor de 1.1 μM . Los otros dos poseen un valor submicromolar, siendo el Li5 el más activo de todos. El compuesto XH5032 utilizado como control negativo, presenta una toxicidad bastante más baja en ambas líneas (Tabla 7).

Aunque los tres compuestos activos poseen un índice R/S bastante más bajo que el de la colchicina, todos ellos son mejor sustrato para la glicoproteína-p que la podofilotoxina, probablemente debido a una mayor hidrofobicidad. A pesar de que los índices R/S no sean tan bajos como en el caso de la podofilotoxina, todos los compuestos son razonablemente activos y disminuyen considerablemente la resistencia debida a la glicoproteína-P.

Compuesto	A2780 (μM)	A2780AD (μM)	R/S
Li5 (\pm)	0.034 \pm 0.003	0.144 \pm 0.005	4.23
XH5094 (\pm)	0.375 \pm 0.002	1.9 \pm 0.4	5.06
XH5085-3 (\pm)	1.1 \pm 0.02	2.7 \pm 0.3	2,45
XH5032	25.2 \pm 1	29.7 \pm 0.6	1.17
Colchicina	0.012 \pm 0,0004	1.45 \pm 0.5	120.8
Podofilotoxina	0.018 \pm 0,0001	0.016 \pm 0.001	0.88

Tabla 7: Citotoxicidad de los compuestos utilizados en el estudio, en comparación con la colchicina y podofilotoxina en células de carcinoma de ovario y en la variante con sobreexpresión de la gp-P. Los datos representan la media \pm erros estándar de tres experimentos. La relación R/S se obtiene al dividir el valor de CI50 de la línea resistente entre el CI50 de la línea sensible.

4.1.3.2. Efecto de los compuestos en el ciclo celular

Una vez que se determinó la capacidad citotóxica de los ligandos estudiados sobre diferentes células resistentes a fármacos, se comenzó a analizar su efecto en el ciclo celular. La capacidad de afectar al ciclo celular está relacionada con la capacidad que tienen los ligandos de bloquear la segregación cromosómica, así como el correcto posicionamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial. Por tanto, el estudio del ciclo celular bajo los efectos de los fármacos permite determinar si son agentes antimitóticos (Abal et al., 2003). Para ello, se realizó un análisis del ciclo mediante citometría de flujo utilizando tinción con yoduro de propidio. Dicho agente fluorescente se intercala en el ADN, de manera que obtenemos histogramas en los cuales se ve el número relativo de células que poseen una cantidad n de ADN. En condiciones normales (control), se observa una primera región con mayor número de células correspondiente a células diploides en fase G_0/G_1 , una segunda región de meseta con células en fase S que se encuentran duplicando el material genético y una fase G_2/M donde las células son tetraploides, habiendo duplicado su material genético, al estar ya iniciada la mitosis. Al añadir algún compuesto que interfiera en el proceso de segregación cromosómica y por tanto, impida la división celular, observamos como la cantidad de células en G_0/G_1 disminuye, mientras que el pico de células en G_2/M aumenta. Esto es debido a que al bloquearse la división, las células se acumulan en esta fase y no se dividen.

Se midieron los tres compuestos activos (Li5, XH5094 y XH5085-3) incubando durante 20 horas con un rango amplio de concentraciones y se vio a que concentración se acumulaban las células en fase G_2/M . Como control positivo en este estudio se utilizó la podofilotoxina cuyo efecto en el ciclo celular es conocido (Alejandre-Garcia et al., 2015) y como control negativo se utilizó el compuesto inactivo XH5032 a concentraciones altas (20-50 μM). Como era de esperar (Figura 21) la concentración más baja para detener el ciclo fue la del Li5 (500 nm), mientras que fue necesaria una concentración más alta (5 μM) para detener el ciclo en el caso de los compuestos XH5094 y XH5085-3. Para el XH5032 se necesitó una concentración cien veces mayor (50 μM) para observar el mismo efecto. Los compuestos afectan a la segregación cromosómica y dado que la tubulina es la principal proteína implicada en

este proceso, se procedió a determinar si esta era efectivamente la diana de los compuestos.

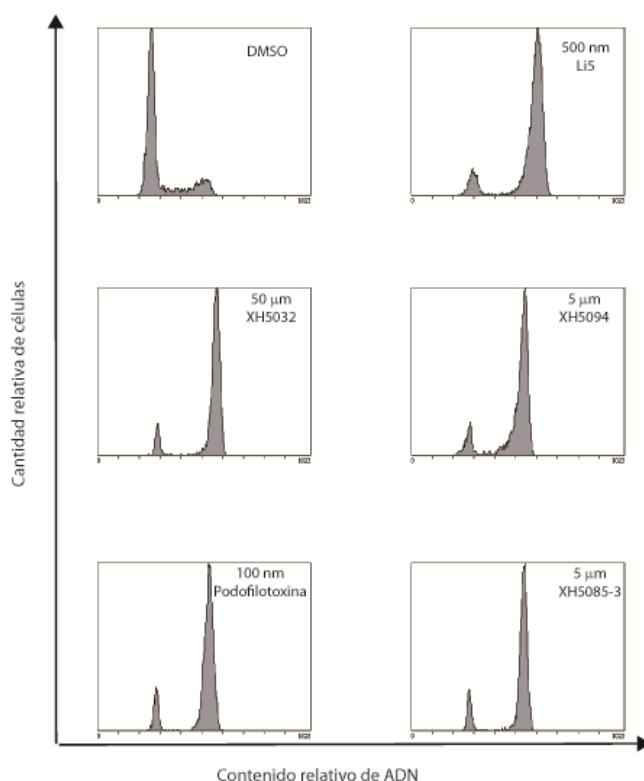


Figura 21: Efecto de los ligandos sobre el ciclo celular en la línea celular A549. Se muestra la mínima concentración en la que se genera la máxima acumulación de células en fase G₂/M del ciclo celular. Como control se utilizó podofilotoxina, así como células tratadas con DMSO.

4.1.3.3. Efecto de los ligandos sobre el citoesqueleto de tubulina

Dado que los compuestos detienen el ciclo celular en G₂/M, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en la línea celular A549 con el objeto de comprobar si este tipo de ligandos afecta a la red microtubular, a la mitosis y a la morfología de los núcleos.

Como controles del experimento se utilizaron muestras con DMSO para observar las células en ausencia de ligando. Asimismo, se utilizó el XH5032 como compuesto inactivo y la colchicina como agente despolimerizante de microtúbulos.

Las imágenes muestran inequívocamente un efecto en la red microtubular. A 50 nM de compuesto Li5 se pueden observar mitosis anormales con distancias cortas entre los polos mitóticos si se comparan con las distancias en los usos de los controles (Figura 22C). Habiendo en algunos de ellos cromosomas rezagados (husos mitóticos de tipo I y II)(Jordan et al., 1991). A esta concentración se puede observar cierta desorganización en los microtúbulos interfásicos y en algunas células se observó despolimerización.

A 100 nM (Figura 22D) ya se encuentra una mayor despolimerización de los microtúbulos interfásicos presentándose algunas células micronucleadas y husos mitóticos de tipo III con el ADN formando esferas y los microtúbulos del huso formando agregados estrellados.

Al aumentar la concentración a 200 nM (Figura 22E) los microtúbulos en interfase se encuentran totalmente despolimerizados pudiendo observarse centrosomas en muy pocas células. Los husos mitóticos a esta concentración son de tipo IV, con el ADN formando esferas y ausencia de agregados de tubulina.

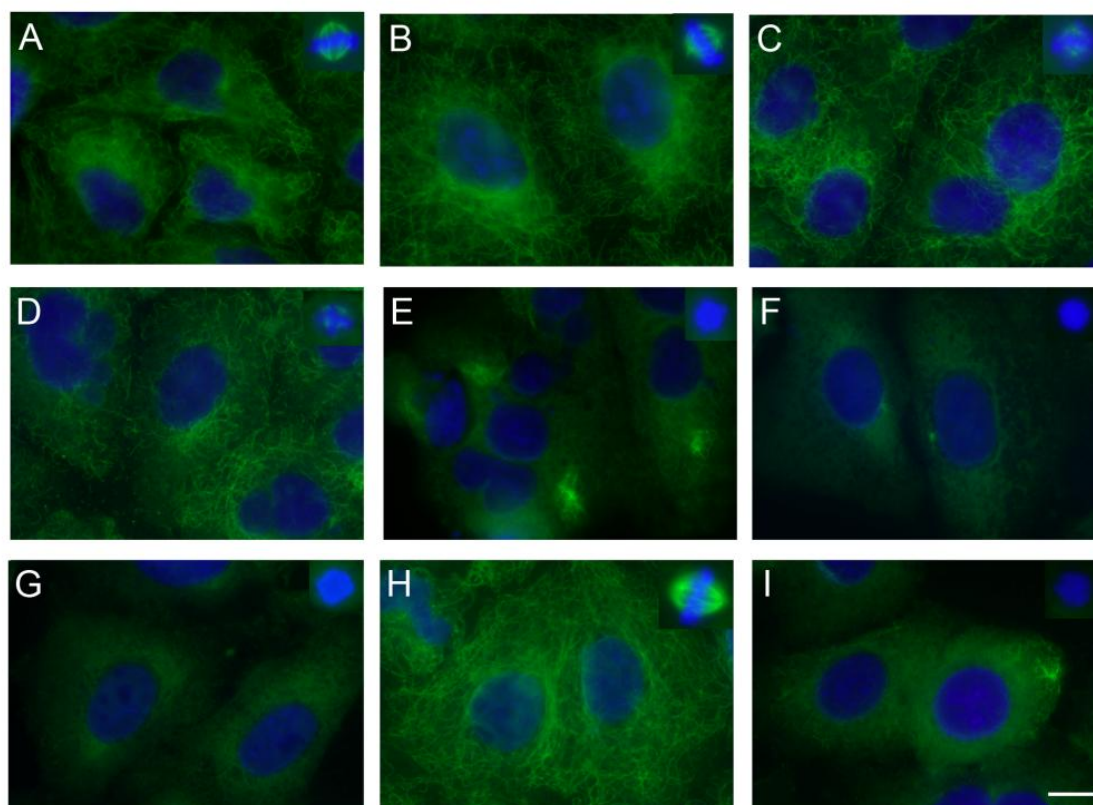


Figura 22: Efecto del compuesto Li5 en la red microtubular del citoesqueleto y en la mitosis de células A549 de carcinoma de pulmón. Las células fueron incubadas 24h con **A)** DMSO, **B)** 20 nM Li5, **C)** 50 nM Li5, **D)** 100 nM Li5, **E)** 200 nM Li5, **F)** 500 nM Li5, **G)** 50 µM Li5, **H)** 200 nM XH5032 y **I)** 50 nM Colchicina. En los recuadros se muestran los husos mitóticos de cada preparación. La barra de escala representa 10 µm. Todos los paneles tienen la misma magnificación.

Con objeto de descartar una actividad estabilizadora a altas concentraciones como la observada con otros ligandos, se probó a incubar células con una concentración muy alta de Li5 (Figura 22G) (Saez-Calvo et al., 2017). Como se puede observar en la figura, a estas concentraciones la red microtubular se encuentra totalmente despolimerizada sin observarse ningún acúmulo de microtúbulos.

Como control negativo se utilizó el XH5032 que a 200 nM (Figura 22H) no produce ninguna alteración visible ni en la red de microtúbulos, ni en los husos ni en los núcleos. Como control positivo se utilizó la colchicina que a una concentración de

50 nM (Figura 22I) ya produce una completa despolimerización del citoesqueleto microtubular y husos mitóticos de tipo IV.

4.1.3.2. Citotoxicidad en células resistentes a fármacos anti-tubulina por sobreexpresión del isotipo β III

Puesto que otro de los mecanismos de resistencia a fármacos es la sobreexpresión de isotipos específicos de β -tubulina, se procedió a analizar la toxicidad en células HeLa transfectadas con un plásmido que sobreexpresa el isotipo β III de la tubulina y comparar dichos datos con la citotoxicidad en células HeLa sin sobreexpresión. Aunque este mecanismo de resistencia a fármacos ha sido descrito principalmente en compuestos que se unen al sitio de taxol, hay posibilidades de que afecte también a colchicinoides debido a la sustitución de la cisteína 239 de los isotipos β -I y β -II por una serina en el isotipo β -III. Dicho residuo se encuentra en el sitio de unión de la colchicina y se ha descrito como uno de los residuos que interviene en interacción con diversos fármacos (Brindisi et al., 2019). Por tanto, se compararon los valores de los compuestos objeto de estudio con diversos colchicinoides. Mediante western blot se determinó que efectivamente la composición isotípica de las células utilizadas era la esperada. Para ello se extrajo la proteína de las células y se utilizaron anticuerpos anti β -I y β -III. Como era de esperar aunque ambas líneas poseen β -I, solo la variante que sobreexpresa β -III presentó expresión de este isotipo (Figura 23).

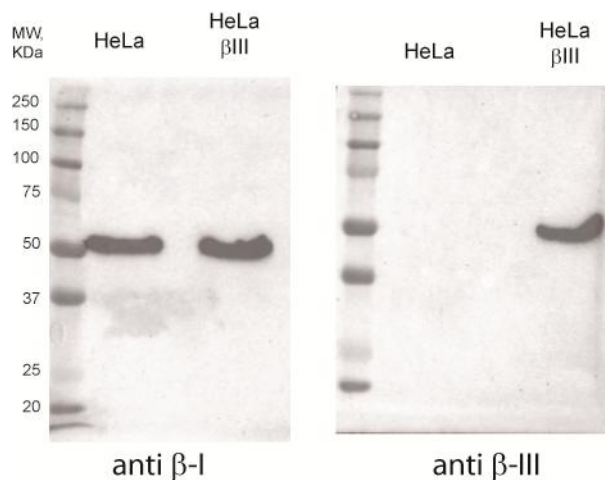


Figura 23: Análisis mediante western blot de la composición de isotipos de las células utilizadas. Se muestra en el primer carril el marcador de peso molecular Dual Color, en el segundo el extracto de células HeLa y en el tercero el extracto de células HeLa β -III.

Se determinó que ninguno de los ligandos del sitio de colchicina se ve muy afectado por la sobreexpresión del isotipo β -III, aunque la resistencia es algo mayor para compuestos como el nocodazol, combretastatina A4 y los compuestos analizados en este estudio, que para la colchicina o la podofilotoxina (Tabla 8). Si bien es cierto que la citotoxicidad para el Li5 y derivados es del doble en HeLa β III que en HeLa, los valores no llegan a ser comparables a los altos niveles de resistencia de compuestos dirigidos al sitio de taxol (Tang et al., 2017).

Compuesto	HeLa	Hela β III	R/S
Taxol	1.6 ± 0.3	26 ± 0.10	16.58
Podofilotoxina	9.2 ± 1.2	11 ± 2.3	1.18
Colchicina	7.2 ± 0.7	6.3 ± 0.5	0.86
Combrestatina A4	25.4 ± 0.4	88 ± 0.1	3.44
Nocodazol	0.12 ± 0.01	0.4 ± 0.001	3.08
Li5 (\pm)	52 ± 15	105 ± 16	2
XH5094 (\pm)	826 ± 95	1845 ± 35	2,2
XH5085-3 (\pm)	2020 ± 269	4050 ± 354	2

Tabla 8: Citotoxicidad de los compuestos utilizados en el estudio al sitio de colchicina, usando taxol y varios compuestos del sitio de colchicina como controles, en células de carcinoma de cérvix y en la variante con sobreexpresión del isotipo β -III. Los datos representan la media \pm errores estándar de tres experimentos. La relación R/S se obtiene al dividir el valor de CI50 de la línea resistente entre el CI50 de la línea sensible.

4.1.4. Determinación de la unión a tubulina *in vitro*

Los datos obtenidos en los ensayos celulares indican que la diana molecular del compuesto es la tubulina. Para confirmar esta unión *in vitro*, se procedió a determinar la unión del Li5 a tubulina mediante fluorimetría. Se midió por triplicado el ligando a 5 μ M de concentración en tampón NaPi tras incubarlo 30 minutos, excitando a 330 nm y monitorizando la emisión de 370 nm a 550 nm, observándose un pico de emisión en torno a 460 nm. Posteriormente se incubó 5 μ M del compuesto con 10 μ M de tubulina durante 30 minutos y se realizó la misma medida. En primer lugar se comprobó que a esta longitud de onda de excitación, el compuesto emitía fluorescencia, observándose un pico en torno a 471 nm. Se observó una señal de emisión diferencial significativa entre el compuesto en su forma libre y el compuesto unido a la tubulina. El aumento de la intensidad de fluorescencia emitida por la unión de un ligando a una proteína es un proceso conocido, que se debe a la alteración del rendimiento cuántico del ligando debido a alguna interacción positiva de éste con alguno de los aminoácidos del sitio de unión, a la disminución de la rotación del ligando o al cambio de entorno al pasar de estar en solución a estar unido (Lakowicz, 1988).

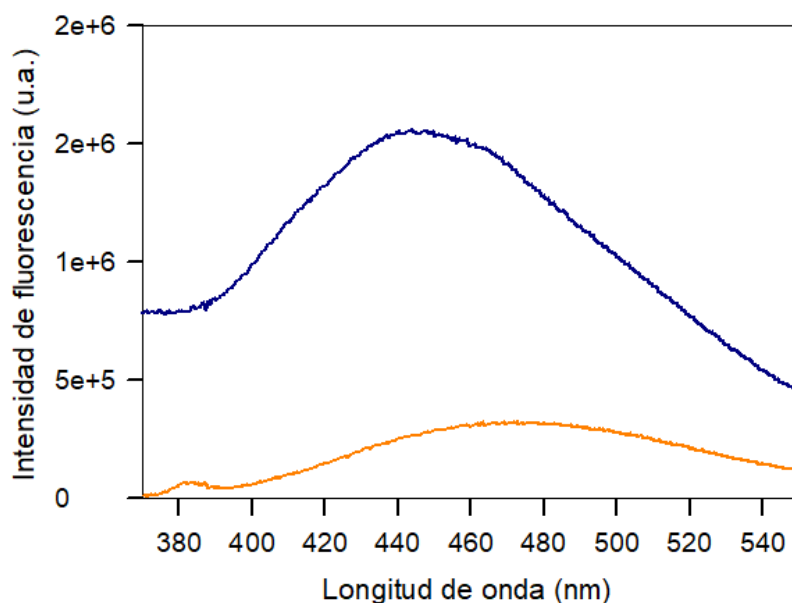


Figura 24: Espectros de emisión de fluorescencia de 5 μM del compuesto Li5 libre (naranja) y unido (azul) tras incubarlo con 10 μM de tubulina. Los espectros se obtuvieron en tampón NaPi 10 mM, GTP 0.1 mM, 25 $^{\circ}\text{C}$.

Por otro lado, se cuantificó la unión mediante HPLC, para lo cual se procedió a incubarlo 25 μM de tubulina con 25 μM de ligando en tampón GAB durante media hora. Después se centrifugó la muestra y se separaron el sobrenadante y precipitado. Las muestras de ambas fracciones fueron extraídas y se midió por HPLC la cantidad de ligando en cada fracción (Figura 25). Se observó una parte del compuesto unida al precipitado, comprobándose nuevamente su unión a tubulina. Sin embargo, se encontró en el sobrenadante más de la mitad del compuesto, lo cual sugiere una afinidad demasiado baja teniendo en cuenta la actividad del orden nM observada en los experimentos de biología celular.

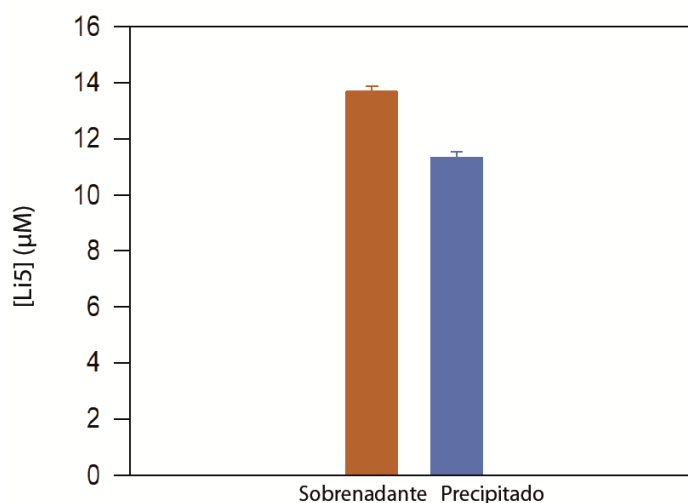


Figura 25: Cuantificación por HPLC de la unión del Li5 (\pm) a la tubulina en tampón GAB 1 mM GTP tras incubar 25 μ M de ligando con 25 μ M de tubulina y posteriormente separar el sobrenadante del precipitado.

Con la idea de determinar la concentración de ligando con la cual se satura la tubulina, se incubó una concentración fija de 25 μ M de ligando con concentraciones crecientes de proteína (hasta 50 μ M). Tras medir la concentración de ligando en el sobrenadante y en el precipitado, se vio que a partir de 25 μ M de tubulina, aproximadamente el 50 % del compuesto se encontraba en el sobrenadante y el 50 % en el precipitado. Este resultado indica que solo la mitad del compuesto presenta capacidad de unión a la tubulina.

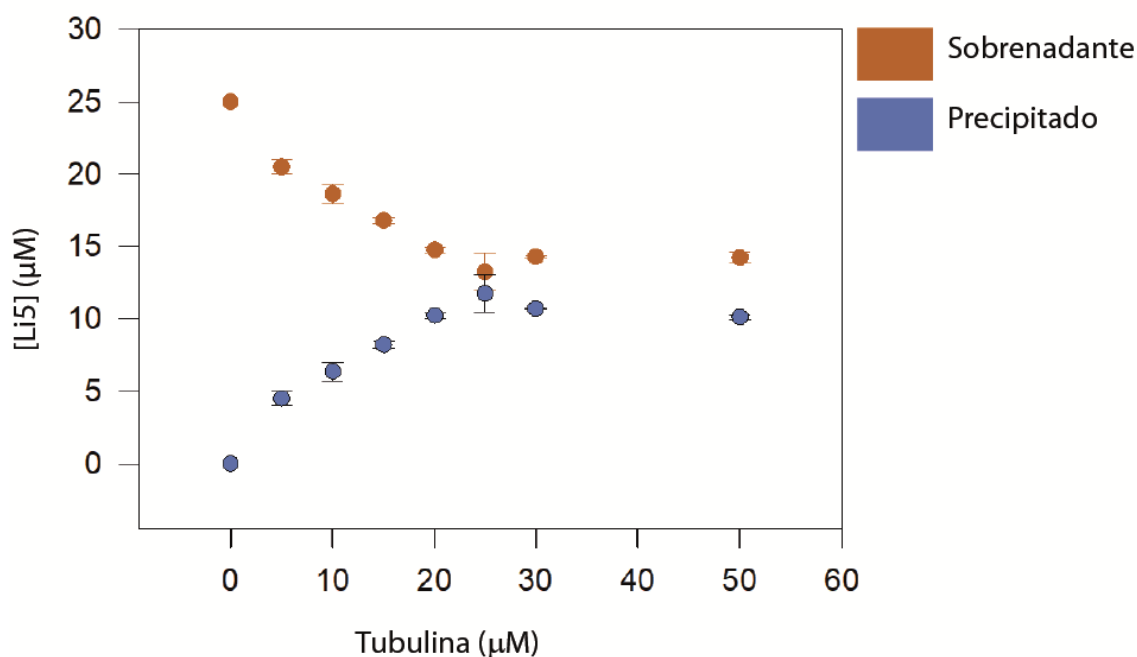


Figura 26: Curva de saturación de tubulina en presencia de 25 μ M de Li5 (\pm) en tampón NaPi 10mM y 0.1mM GTP. Los puntos azules muestran el compuesto activo unido al precipitado y los naranjas el compuesto libre en el sobrenadante.

En los ensayos celulares se comprobó que la forma oxidada del compuesto (XH5032) posee una actividad muy baja. Al reducirse el compuesto, el C7 del anillo de pirimidina pasa a ser un átomo quiral, pudiendo generar dos conformaciones específicas. Por tanto, se planteó la posibilidad de que el ligando Li5 estuviera constituido por una mezcla racémica, siendo activa solo una de las dos formas enantioméricas. Para ello se procedió a analizar su actividad óptica mediante dicroísmo circular.

4.1.5. Análisis de la actividad óptica del compuesto Li5

Para determinar si el ligando se encontraba en una forma quiral pura o era una muestra racémica, se procedió a medir el espectro de dicroísmo circular del compuesto Li5 (\pm) a una concentración de 250 μ M en etanol de grado espectroscopía.

La técnica de dicroísmo circular está basada en la absorción diferencial de luz polarizada circularmente. Los compuestos orgánicos que poseen un carbono quiral en su estructura, tienen la capacidad de absorber diferencialmente la luz según se encuentre polarizada circularmente a la derecha o a la izquierda según la disposición de dicho carbono. Puesto que el compuesto Li5 posee en su estructura un carbono quiral existen dos posibles enantiómeros que absorberán la luz polarizada circularmente de forma diferencial.

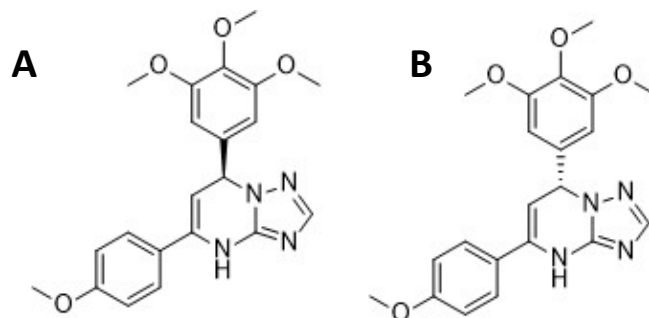


Figura 27: Estructura química de las dos formas enantioméricas del Li5, se puede observar que el carbono quiral C7 genera dos disposiciones tridimensionales del anillo trimetoxibenceno. **A)** Enantiómero S, **B)** Enantiómero R.

Si la muestra está formada por una mezcla equimolar de ambos enantiómeros, se denomina mezcla racémica y en este caso la cantidad de luz absorbida a la izquierda es igual que la absorbida a la derecha, por lo que las intensidades se anulan y el espectro de dicroísmo circular es plano. Como se puede observar en la Figura 28, el espectro de dicroísmo del compuesto Li5 (\pm) presenta valores en torno a cero desde 240 nm a 350 nm indicando que el compuesto carece de actividad óptica, lo cual es indicativo de que nuestra muestra está constituida por un 50% de cada uno de los enantiómeros (R- y S-).

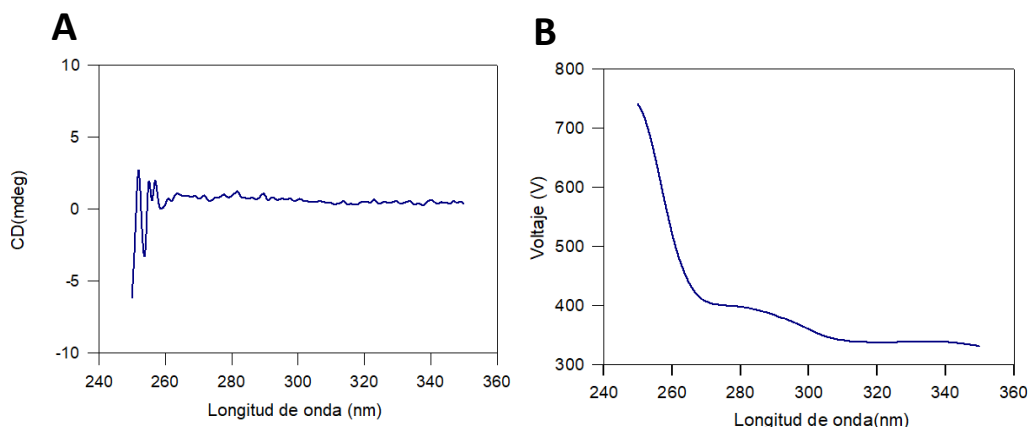


Figura 28: A) Espectro de dicroísmo circular del compuesto Li5 (\pm). **B)** Cambios en el voltaje a lo largo de las medidas tomadas.

Para conocer si la actividad es debida a que solo uno de los dos enantiómeros es activo se procedió a separar la parte activa de la inactiva. Se incubó 30 μM de tubulina y 25 μM de Li5 (\pm) para asegurarse de que todo el compuesto activo se encuentra unido. Se separó la fracción de compuesto unida al polímero amorfo mediante centrifugación de las muestras para precipitar toda la proteína. Se comprobó por HPLC la cantidad de compuesto unido y libre observándose un cincuenta por ciento en cada una de las dos fracciones. Tras secar las muestras, estas se resuspendieron en etanol para su medición en el dicrógrafo, donde se observaron para la forma activa e inactiva dos espectros de dicroísmo circular simétricos (Figura 29).

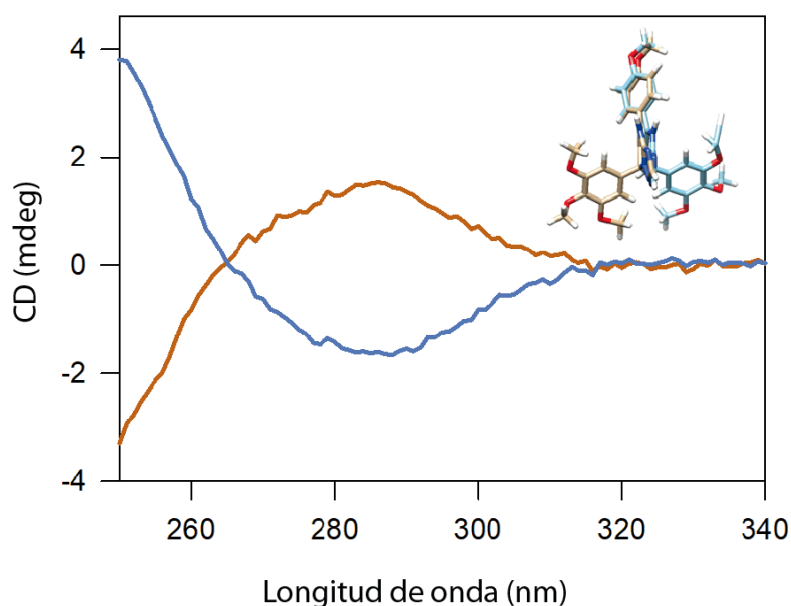


Figura 29: Espectros de dicroísmo circular del compuesto unido al precipitado (azul) y del compuesto libre en el sobrenadante (naranja). Se muestra la representación tridimensional de los dos enantiómeros S (azul) y R (marrón) en la esquina superior derecha.

A pesar de que mediante esta metodología no fue posible discernir cuál era el enantiómero que presenta capacidad de unirse a la tubulina, se pudo determinar que solo uno de los dos es activo y por tanto se tuvo en cuenta a la hora de realizar todos los experimentos, realizándose las correcciones oportunas para tener en cuenta un cincuenta por ciento de actividad.

Por tanto, se procedió en primer lugar a recalcular los valores de IC_{50} , parada de ciclo celular e inmunofluorescencia, teniendo en cuenta que del compuesto añadido, solo la mitad posee actividad, por lo que todos estos valores se dividieron por dos. Cabe la posibilidad de que la parte correspondiente al compuesto inactivo pueda tener algún tipo de efecto citotóxico al actuar en otra diana pero al no tener muestras del enantiómero activo puro, se asumió que los efectos observados en células se debían únicamente a la parte activa. En los apartados siguientes de este trabajo, las concentraciones mostradas para el Li5 hacen referencia a la concentración de ligando activo.

CI50 A549 (nM)	CI50 A2780 (nM)	CI50 A2780 AD (nM)	CI50 HeLa (nM)	CI50 HeLa β III (nM)	Parada en G2/M (nM)	Despolimerización de la red microtubular (nM)
9	17	72	26	52.4	250	100

Tabla 9: Valores corregidos del efecto del compuesto Li5 en células teniendo en cuenta que solo un 50% de este presenta capacidad de unirse a la tubulina

4.1.6. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de la tubulina

El proceso de ensamblaje de la tubulina es cooperativo y se produce mediante una condensación nucleada no covalente, para determinar la intensidad con la que un compuesto puede afectar al ensamblaje de tubulina se utiliza el parámetro denominado concentración crítica (Cr) que se define como el valor por encima del cual la tubulina en equilibrio polimeriza y forma microtúbulos (Himes et al., 1977)

Así, los compuestos que inducen la despolimerización de la tubulina, poseen valores de Cr altos y los compuestos que inducen la polimerización, poseen valores bajos de Cr. Como se puede observar en la figura, los tres compuestos activos producen despolimerización de la tubulina dando lugar a valores de Cr altos, similares a los valores que se obtienen con la colchicina. El compuesto XH5032 produce un ligero aumento del valor de Cr con respecto al control con DMSO, pero no es un cambio muy significativo. Como control positivo se utilizó docetaxel, que como puede verse en la figura disminuye el valor de Cr.

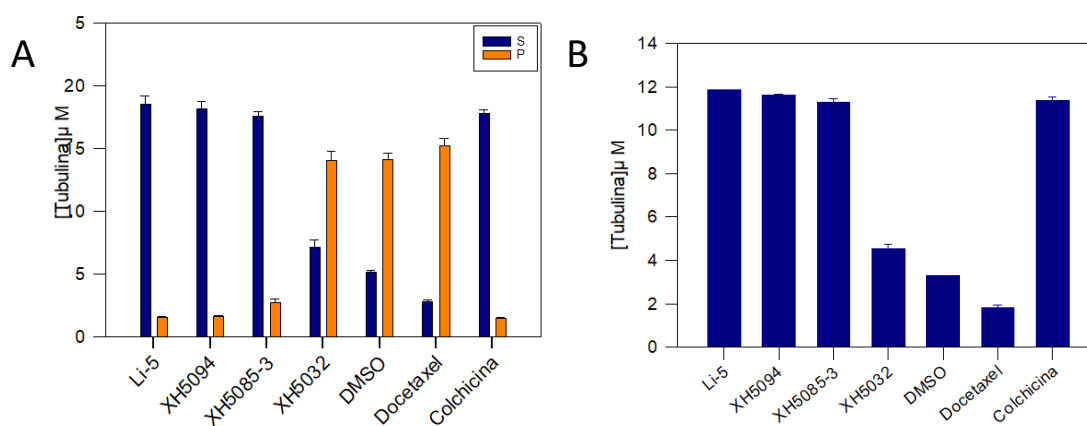


Figura 30: Efecto de los compuestos objeto de estudio sobre la polimerización de la tubulina. **A)** Cantidad de tubulina presente en el sobrenadante y en el precipitado tras incubación con los diferentes ligandos. **B)** Valor de Cr para cada uno de los ligandos estudiados.

Una vez que se determinó que los compuestos producían despolimerización de la tubulina, se procedió a determinar su efecto en la cinética de ensamblaje. Para ello se incubó la tubulina en tampón GAB con concentraciones crecientes de Li5 y se midió espectrofotométricamente el cambio de turbidez por absorbancia a 350 nm. Mediante esta técnica se puede ver como el estado de agregación de la tubulina va cambiando con el tiempo (Mirigian et al., 2013). La cantidad de luz dispersada en solución

aumenta conforme los dímeros ensamblan formando polímeros, siendo esta dispersión detectada a través de un aumento en la densidad óptica. No obstante, este incremento en no nos permite discernir entre diferentes formas poliméricas. En el caso de compuestos que inducen en desensamblaje de tubulina como el Li5, la cantidad de turbidez disminuye conforme aumenta la cantidad de ligando ya que se induce la despolimerización y los dímeros en solución carecen de capacidad de dispersar la luz.

Como se puede ver en la figura, a partir de 1 μM la despolimerización comienza a ser evidente observándose incluso un pequeño descenso de la polimerización a 0.5 μM . Cuando se alcanza la concentración de 10 μM toda la tubulina se encuentra despolimerizada y la turbidez se encuentra cercana a cero. Sin embargo, al aumentar la concentración por encima de 10 μM , vemos como se vuelve a generar algún tipo de oligomerización y los valores de turbidez llegan incluso a retornar a los valores de absorbancia de 2 μM cuando añadimos 40 μM de compuesto.

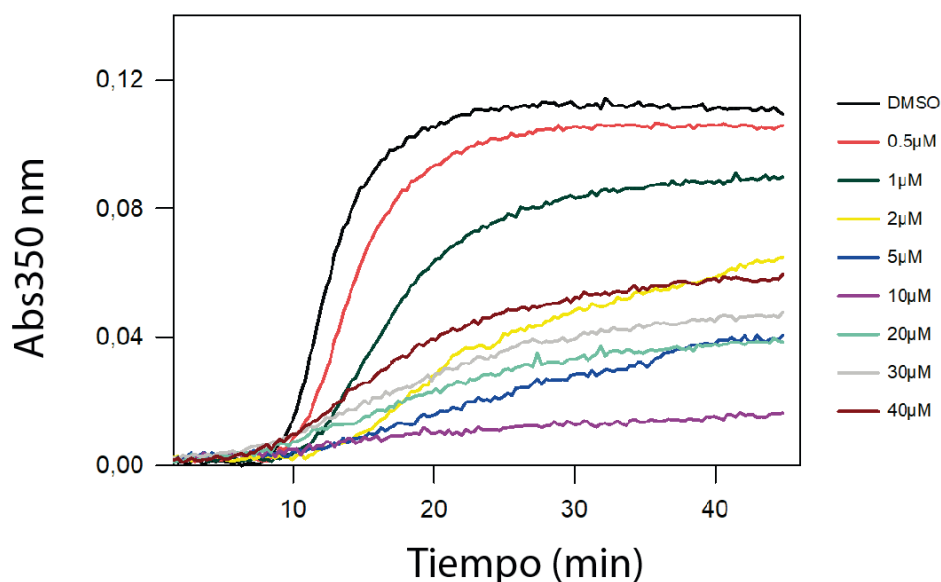


Figura 31: Curvas de polimerización de la tubulina en presencia de concentraciones crecientes de Li5 en tampón GAB con GTP 1 mM.

4.1.7. Análisis de la oligomerización inducida por el Li5

Con el objeto de determinar si estos polímeros formados a altas concentraciones de ligando poseen un coeficiente de sedimentación equivalente al de los microtúbulos, se realizó un experimento incubando tubulina a concentraciones crecientes de Li5 y centrifugando a 50000 rpms 20 minutos, ya que a esta velocidad y tiempo los microtúbulos precipitan. Se midió la cantidad de tubulina precipitada en cada concentración de ligando y se observó que los agregados formados de 20 a 40 μM de Li5, no poseen el mismo coeficiente de sedimentación que los microtúbulos por lo que se dedujo que debía tratarse de otro tipo de oligómero.

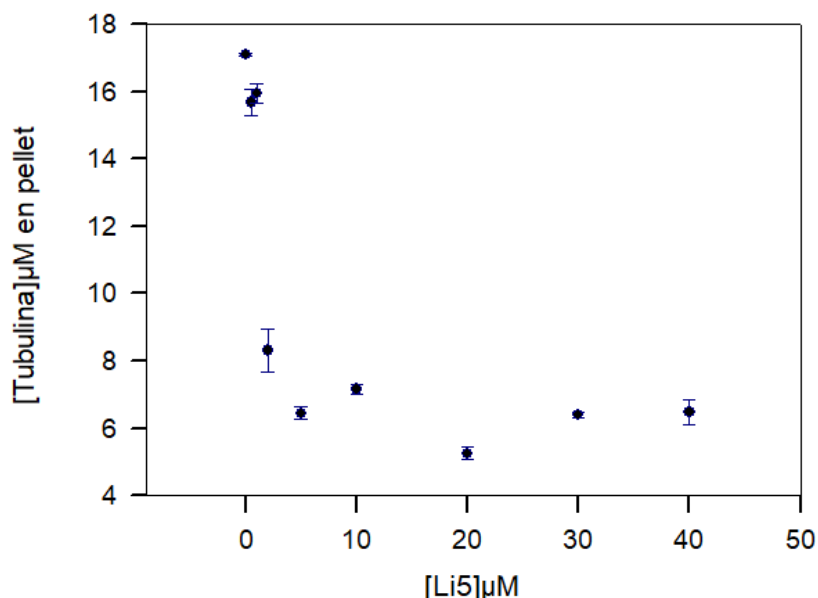


Figura 32: Concentración de tubulina en el precipitado tras incubación con concentraciones crecientes de Li5 y precipitar centrifugando a 50000 rpm 20 minutos.

Para caracterizar la oligomerización producida a concentraciones altas de Li5, se procedió a obtener imágenes de microscopía electrónica. Para ello se incubó tubulina en presencia de concentraciones de Li5 a las cuales se observó despolimerización en los ensayos de turbidimetría y en presencia de concentraciones donde se ve aumento de turbidez. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído y teñidas con acetato de uranilo para observarlas al microscopio. Se observa que a concentraciones bajas de Li5 disminuye la cantidad de microtúbulos presentes en las muestras, siendo estos más cortos que los del control. En cambio, cuando la concentración es alta, se observan agregados heterogéneos de proteína sin una estructura aparente definida. Este tipo de agregados son similares a los que hay descritos en la literatura para complejos de tubulina-colchicina con concentraciones altas de magnesio (16 mM) (Andreu and Timasheff, 1982) (Andreu et al., 1983), sin embargo, en el caso del Li5 no parece requerirse esas concentraciones de magnesio para generar dichos agregados.

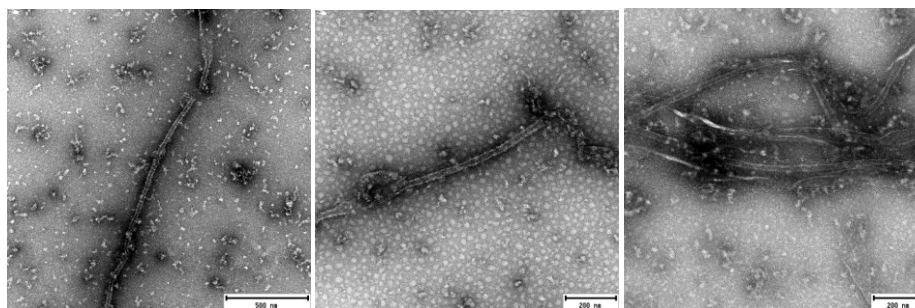


Figura 33: Micrografías electrónicas de polímeros de tubulina en presencia de Li5. **A)** DMSO **B)** 1 μM Li5 **C)** 20 μM Li5.

4.1.8. Determinación del sitio de unión y de la unión a diferentes estados de agregación

Una vez conocido que la diana celular y bioquímica del Li5 es la tubulina, se procedió a determinar la capacidad del compuesto para unirse a diferentes estados de agregación de la tubulina, así como a confirmar que el sitio de unión corresponde con el sitio de unión de la colchicina.

4.1.8.1. Unión a dímeros de tubulina y ensayo de desplazamiento con podofilotoxina

En primer lugar, puesto que se trata de un agente desestabilizante de tubulina se procedió a caracterizar su unión a tubulina dimérica, además de determinar su desplazamiento por la podofilotoxina, para así confirmar el sitio de unión. Para ello se realizó en primer lugar un ensayo de ultracentrifugación analítica (AUC) para determinar la unión en condiciones donde se impide la oligomerización (tampón PEDTA 1.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP). Mediante la técnica de AUC se mide por un lado la interferencia de la proteína y por otro la absorbancia del ligando unido. De esta forma al tratarse de condiciones donde se favorece la formación de dímeros, se observa un único pico en torno a un coeficiente de sedimentación de 6S. A pesar de que la absorción del compuesto a 330 es baja, se utilizó esta longitud de onda para monitorizarlo ya que permite evitar solapamientos con la absorción por parte de la proteína. Como se ve en la figura, en ausencia de podofilotoxina la señal de absorbancia del Li5 se encuentra en torno a 0.012 y en presencia de podofilotoxina baja hasta ser prácticamente cero.

Por otro lado, se intentó cuantificar la cantidad de ligando unido y desplazado mediante HPLC. Para ello se incubó tubulina en presencia de Li5 con y sin podofilotoxina. Se centrifugó y se separó la muestra en una mitad inferior y una superior. Mediante la cantidad en la mitad inferior, se determinó cuanto correspondía a ligando unido, y se vio que tanto en tampón NaPi como en PEDTA, todo el compuesto se encuentra unido ya que la concentración de enantiómero activo es menor que la concentración de proteína añadida, siendo de $12.5\mu\text{M}$ con respecto a los $25\mu\text{M}$ de tubulina. Se intentó desplazar el compuesto unido añadiendo $25\mu\text{M}$ de podofilotoxina pero la cantidad desplazada fue tan solo de un 35% en tampón NaPi y un 25% en tampón PEDTA. Al añadir el doble de podofilotoxina la cantidad de compuesto desplazado solo aumentó levemente, por lo que se deduce que el Li5 tiene una afinidad mayor que la podofilotoxina.

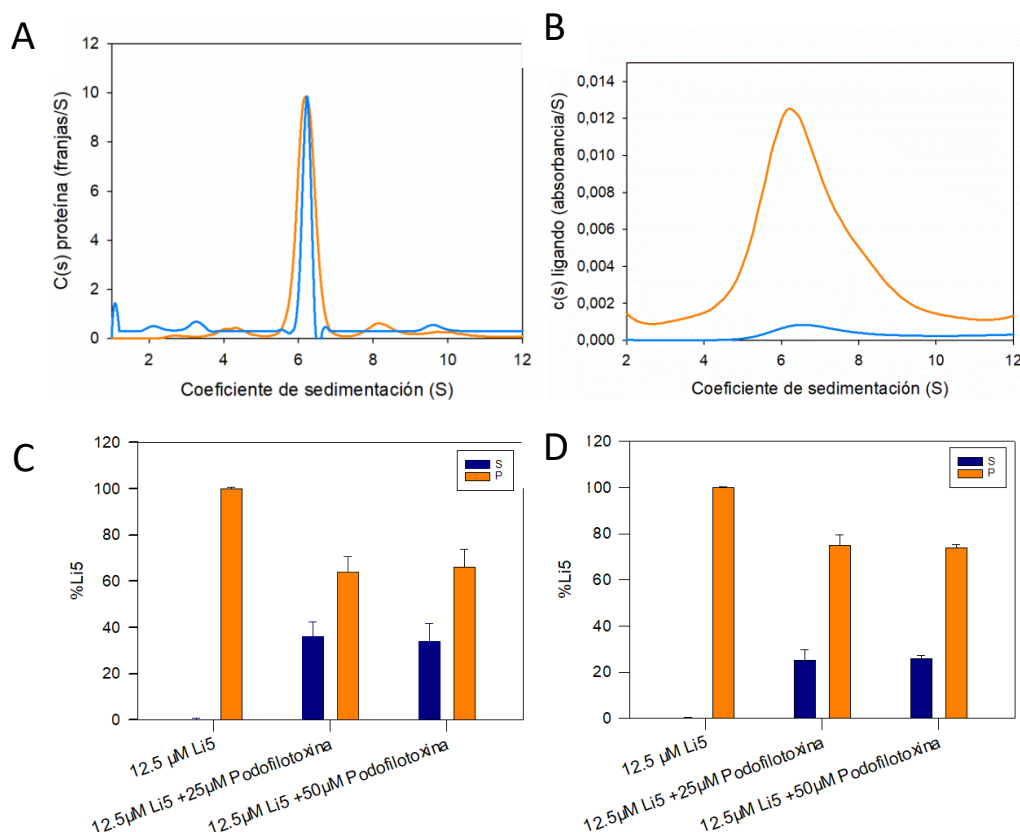


Figura 34: Unión del Li5 a tubulina dimérica. Perfil de sedimentación medido mediante interferencia **(A)** o absorbancia **(B)** tras incubación 10 μ M de tubulina y 12.5 μ M de Li5 en ausencia (naranja) o presencia (azul) de 200 μ M de podofilotoxina. **(C)** Unión del Li5 y desplazamiento por podofilotoxina medido por HPLC en tampón NaPi 0.1 mM GTP. **(D)** Unión del Li5 y desplazamiento por podofilotoxina en tampón PEDTA 1.5 mM MgCl₂ y 0.1 mM GTP.

4.1.8.2. Unión a tubulina polimérica y ensayo de desplazamiento con colchicina

Para cuantificar la unión en condiciones donde se está dando el proceso de formación del polímero anómalo, se incubó tubulina en tampón GAB, en presencia de Li5 o de su forma oxidada inactiva (XH5032), con el objeto de monitorizar su unión. El Li5 en su forma activa se encontraba en una concentración de 12.5 μ M frente a una concentración de tubulina de 25 μ M. Tras incubación en condiciones de polimerización 37 °C 1 hora, toda la proteína se precipitó mediante centrifugación a 100000 rpm y se determinó la cantidad de compuesto unido, siendo en el caso del Li5 de un 93% y en el caso del XH5032 de un 5% por lo que se concluye que el Li5 también se une a la tubulina en condiciones de ensamblaje. De forma paralela se incubaron muestras en presencia de colchicina para comprobar el desplazamiento, que en este caso fue de un 90%.

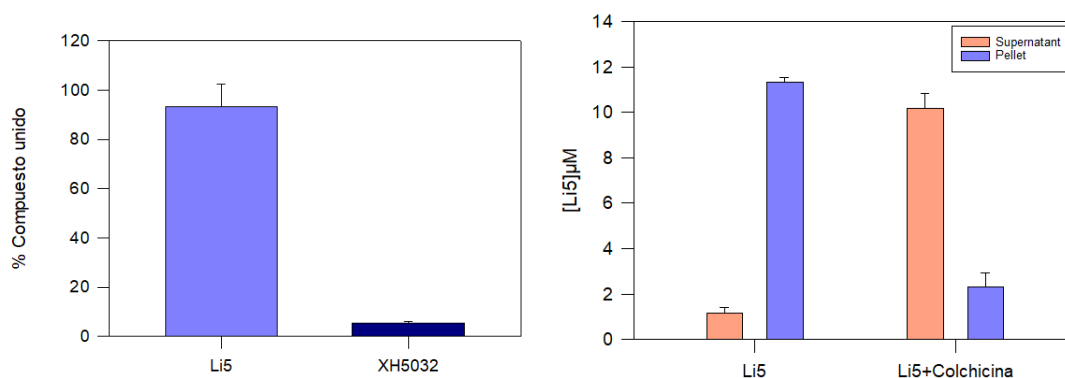


Figura 35: A) Unión de 12.5 μ M Li5 y 25 μ M XH5032 a polímeros anómalos formados con 25 μ M de tubulina incubando a 37 °C en tampón GAB 1 mM GTP. **B)** Desplazamiento del Li5 unido a polímeros mediante adición de colchicina. Se muestra en azul el precipitado y en naranja el sobrenadante.

4.1.8.3. Unión a microtúbulos estabilizados y desplazamiento

Debido a que la tubulina presenta una conformación diferente cuando está formando microtúbulos, se procedió a determinar si el compuesto era capaz de unirse a microtúbulos ya estabilizados con glutaraldehído. En este caso tan solo un 50% del compuesto se encuentra unido, lo cual es de esperar ya que en el microtúbulo el sitio de unión se encuentra menos accesible. Además, al añadir podofilotoxina o colchicina, el desplazamiento fue menor que en los casos anteriores, llegando a mantenerse unido entre un 33-37% de Li5. Una pequeña fracción del XH5032 se encuentra unida a los microtúbulos, quizás debido a uniones inespecíficas.

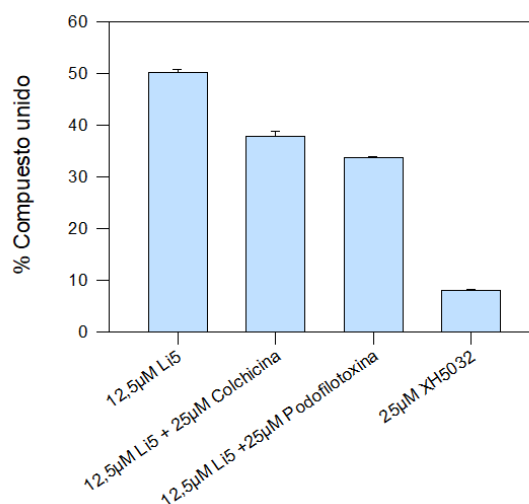


Figura 36: Unión del compuesto Li5 a microtúbulos estabilizados y desplazamiento por colchicina y podofilotoxina.

4.1.8.4.Unión al complejo T2R

Por último, se procedió a determinar la capacidad del Li5 de unirse a tetrámeros estabilizados con RB3. RB3 es una proteína que comparte el dominio de unión a microtúbulos con la estatmina u oncoproteína Op18, la cual es un factor que a nivel celular contribuye a la desestabilización de microtúbulos. Se une a dos dímeros alineados formando la estructura que se conoce como complejo T₂R formado por dos dímeros de tubulina y una molécula de RB3, impidiendo su posibilidad de desensamblarse o de formar microtúbulos por lo que constituye un tetrámero estabilizado. Los ensayos de cristalografía realizados más adelante en este trabajo requieren de la unión del Li5 al complejo T2RT, motivo por el cual se caracterizó la unión al tetrámero.

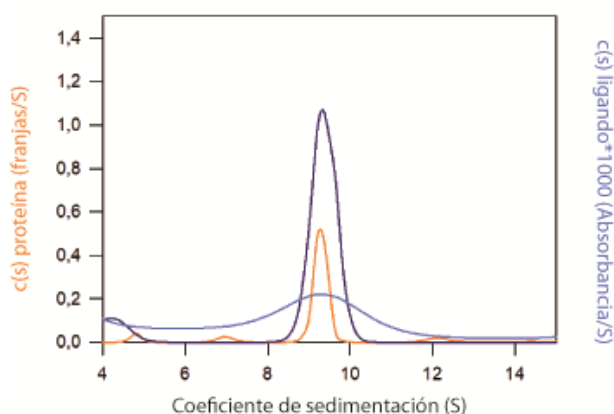


Figura 37: Unión del Li5 a tetrámeros estabilizados con RB3 (T2R). En azul oscuro y azul claro se muestra la absorbancia del ligando antes y después de añadir podofilotoxina respectivamente. En naranja se muestra la interferencia de la proteína con un coeficiente de sedimentación de 9.5S que corresponde con el del tetrámero T2R.

4.1.9. Determinación de la estequiometría de unión a polímeros de tubulina y en el complejo T2R

Una vez se estableció el sitio de unión del compuesto Li5, se procedió a obtener información sobre la estequiometría de unión tanto en el polímero anómalo como en el complejo T2R. Se incubaron muestras de tubulina en concentraciones crecientes de ligando en tampón GAB, se añadieron concentraciones de 0 a 42.5 μM de Li5, manteniendo fija la concentración de proteína a 25 μM . Las muestras se centrifugaron y se procesaron de acuerdo a como esta explicado en el Material y métodos (apartado 3.8.5). La concentración de tubulina en los sobrenadantes y precipitados se determinó por BCA para tener la seguridad de que toda la proteína precipita en el ensayo tal y como se muestra en la Figura 38.

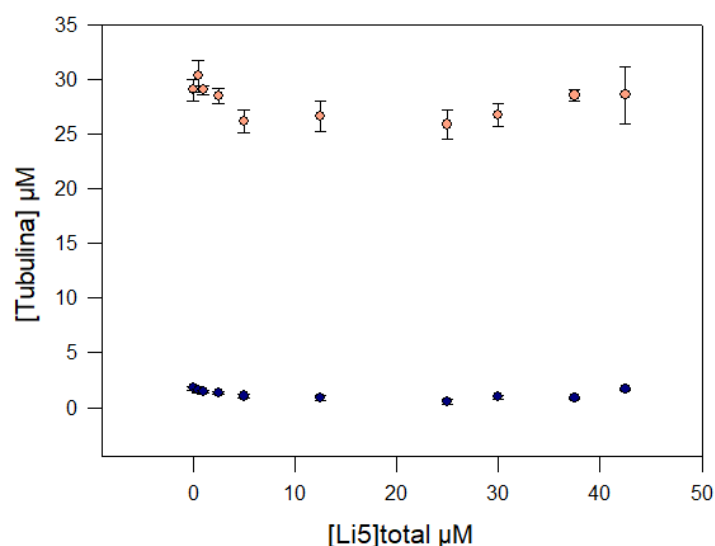


Figura 38: Cantidad de tubulina en las muestras de sobrenadantes (azul) y precipitados (naranja) medidas mediante ensayo de BCA tras la separación mediante centrifugación.

Mediante este ensayo, al aumentar la concentración de ligando total añadido, se observa como la cantidad de ligando unido al precipitado aumentan hasta llegar al nivel de saturación. Una vez se alcanza dicha saturación, la concentración en el precipitado se mantiene constante observándose una meseta. En el sobrenadante la concentración continua aumentando conforme aumenta la cantidad de ligando total añadido. De esta forma se puede determinar que el compuesto Li5 alcanza la meseta a una concentración de 12.5 μM y por tanto se concluye que la estequiometría de unión ligando-proteína es de 0.5:1.

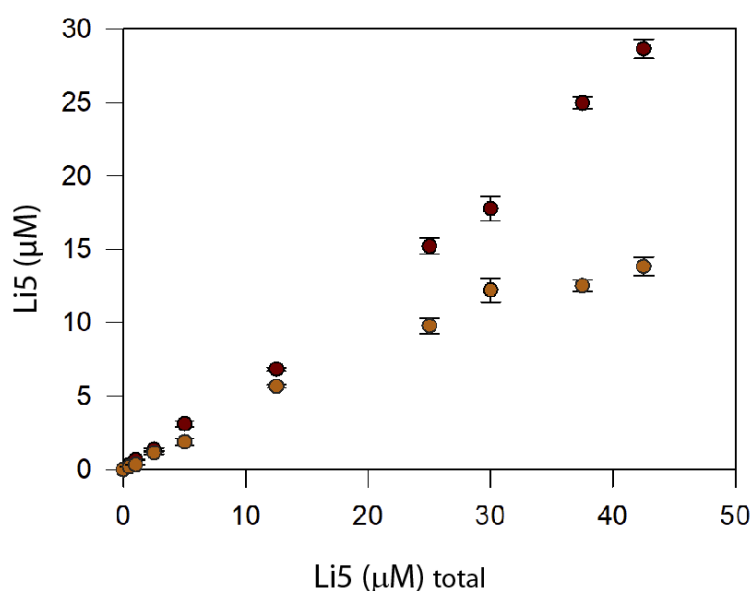


Figura 39: Estequiometría de unión de concentraciones crecientes de Li5 con 25 μM de tubulina en tampón GAB 0.1 mM GTP donde se ve la cantidad de ligando en los sobrenadantes (rojo) y en los precipitados (naranja).

Tras determinar la estequiometría de unión del ligando en estas condiciones, se procedió a determinar la estequiometría en tetrámeros estabilizados con RB3, en este caso mediante un ensayo de ultracentrifugación analítica. Se incubaron muestras con una concentración de 10 μM de tubulina y 7.5 μM de RB3 para la formación del complejo T_2R . Utilizando esas proporciones de tubulina y RB3, toda la proteína forma tetrámeros (Saez-Calvo et al., 2017). Una vez formado el complejo, se añadieron concentraciones crecientes de Li5 (1-40 μM) y la cantidad de ligando unido al tetrámero fue medida mediante detección de absorbancia por ultracentrifugación analítica. De esta forma, se determinó que la cantidad de ligando unido se estabiliza cuando la cantidad de ligando total es de 10 μM por lo que la estequiometría en T_2R es 1:1, concluyéndose así que el ligando solo se une a uno de los dos dímeros que constituyen el tetrámero.

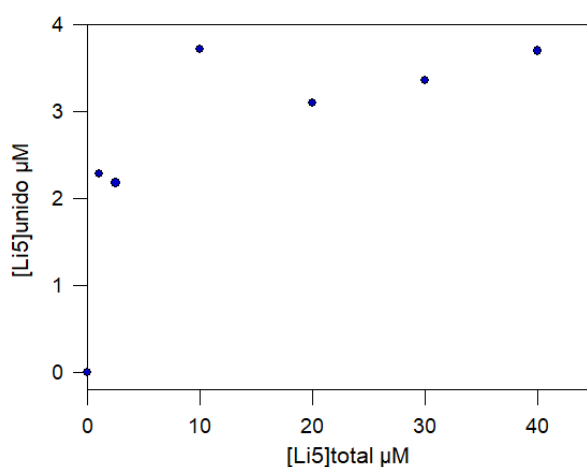


Figura 40: Estequiometría de unión del Li5 a tetrámeros T_2R (10 μM de tubulina) medida mediante AUC.

4.1.10. Determinación de la constante de afinidad

Una vez conocida la acción del compuesto Li5 a nivel celular y bioquímico, se planificó un ensayo para poder determinar la constante de afinidad del compuesto con la tubulina dimérica, con el objeto de poder comparar la afinidad con la de otros compuestos conocidos. Para ello se realizó un ensayo de competición con podofilotoxina (ecuación 2).

$$K_{\text{Li5}} = \frac{[\text{Li5}]_{\text{unido}} [\text{Podofilotoxina}]_{\text{libre}}}{[\text{Podofilotoxina}]_{\text{unida}} [\text{Li5}]_{\text{libre}}} K_{\text{podofilotoxina}}$$

Ecuación 2: Donde K_{Li5} es la constante de afinidad del compuesto Li5 y $K_{\text{podofilotoxina}}$ es la constante de la podofilotoxina, la cual ha sido previamente calculada y tiene un valor de $(18.5 \pm 0.66) \times (10^6 \text{M}^{-1})$ (Antunez-Mojica et al., 2016).

Se incubó 20 μM de tubulina con 25 μM de Li5 y se añadieron concentraciones crecientes de podofilotoxina para desplazar el Li5 unido. Se determinó la concentración de la fracción molar de compuesto activo unido a dímeros de tubulina para cada punto mediante HPLC. Se produce una disminución de la cantidad de compuesto activo unido al aumentar la cantidad de competidor. De esta forma se obtuvo una curva de desplazamiento que permitió hacer un ajuste para calcular la constante de afinidad a 25°C mediante la utilización del programa Equisgra v5.0 (Diaz and Buey, 2007). La constante de unión del Li5 tiene un valor de $21 \pm 0.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, lo cual supone una afinidad de un orden de magnitud mayor que la de la podofilotoxina o la colchicina ($1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, (Fernando Diaz and Andreu, 1991).

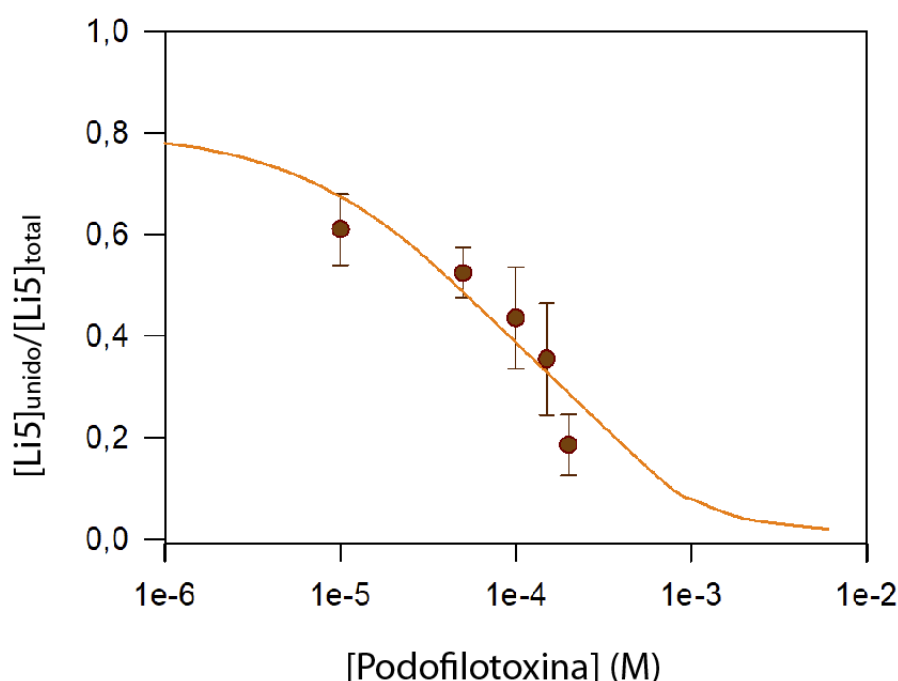


Figura 41: Curva de desplazamiento de 25 μM Li5 unido a 20 μM de tubulina, mediante la adición de concentraciones crecientes de podofilotoxina en tampón NaPi 10 mM, GTP 0.1 mM.

4.1.11. Determinación de la estructura del complejo tubulina-ligando por cristalografía de rayos X

Para comprender mejor el mecanismo de acción del compuesto, este fue caracterizado a nivel estructural mediante cristalografía de rayos X. La estructura a alta resolución (2.4 Å) muestra que el compuesto Li5 se une al sitio de colchicina el cual está localizado en la interfaz entre las subunidades α y β (Figura 42B). Este sitio está constituido por varias láminas de la subunidad β (S1-S10), el loop β T7, dos hélices de β (H7 y H8) y el loop T5 de la subunidad α . La nomenclatura utilizada para nombrar las estructuras secundarias y la secuencia se basa en (Lowe et al., 2001).

Se observó densidad electrónica únicamente en el sitio de colchicina del dímero de tubulina que se encuentra en contacto con TTL (Figura 42A). La presencia en uno solo de los dímeros era esperable tras haber calculado una estequiometría en T_2R de 1:1 en los experimentos de AUC (apartado 4.1.9.). Esta densidad electrónica (Figura 42C) permite la asignación inequívoca del compuesto Li5 con la configuración enantiomérica S. La configuración del enantiómero R impide que el anillo trimetoxifenil se encuentre situado dentro de la densidad (Figura 42C). La unión del ligando no afecta a la conformación global del complejo, observándose un valor de r.m.s.d. de 0.275 (calculada sobre 1924 átomos) al superponer con la estructura libre de ligando (PDB 4I55) (Figura 42A).

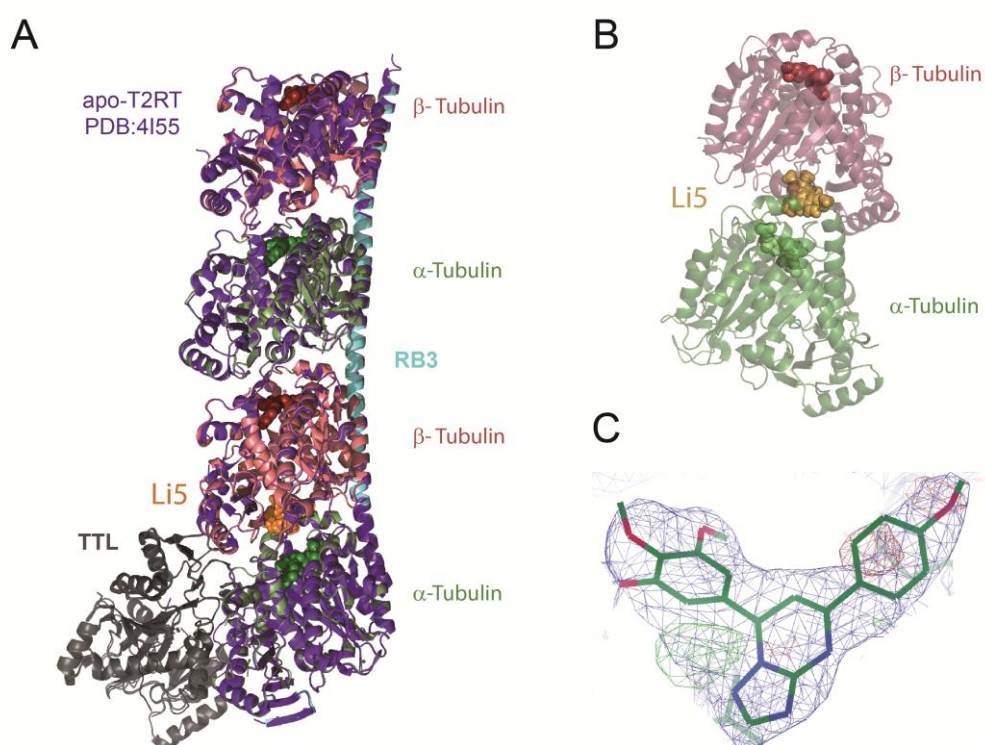


Figura 42: **A)** Visión global del complejo T2RT-Li5 superpuesto con la estructura del complejo apo (PDB 4I55). **B)** Detalle del Li5 unido al dímero de tubulina. **C).** Mapa de densidad electrónica del compuesto Li5 en el sitio de unión. La densidad está menos definida en la región del anillo metoxifenil.

Al comparar el sitio de unión con la forma apo se puede observar un desplazamiento del bucle $\beta T7$ para acomodar al compuesto en el sitio de unión (Figura 43A). Este cambio conformacional se ha visto en otros ligandos del sitio de colchicina (Prota et al., 2014c).

A partir de la estructura cristalográfica se observaron dos interacciones del compuesto con el sitio de unión (Figura 43B). El Li5 establece un puente de hidrógeno fuerte (2.2Å) con el oxígeno de la $\alpha Thr179$ a través del hidrógeno correspondiente al nitrógeno en posición 4 del anillo de pirimidina. Además se observa un segundo puente de hidrógeno (3.1Å) que se da entre el oxígeno del grupo metoxi central del anillo trimetoxifenil y el hidrógeno de la cadena lateral de la $\beta Cys241$. Como se

comentará en la discusión estas interacciones se han descrito en otras estructuras cristalográficas correspondientes a otros ligandos del sitio de colchicina.

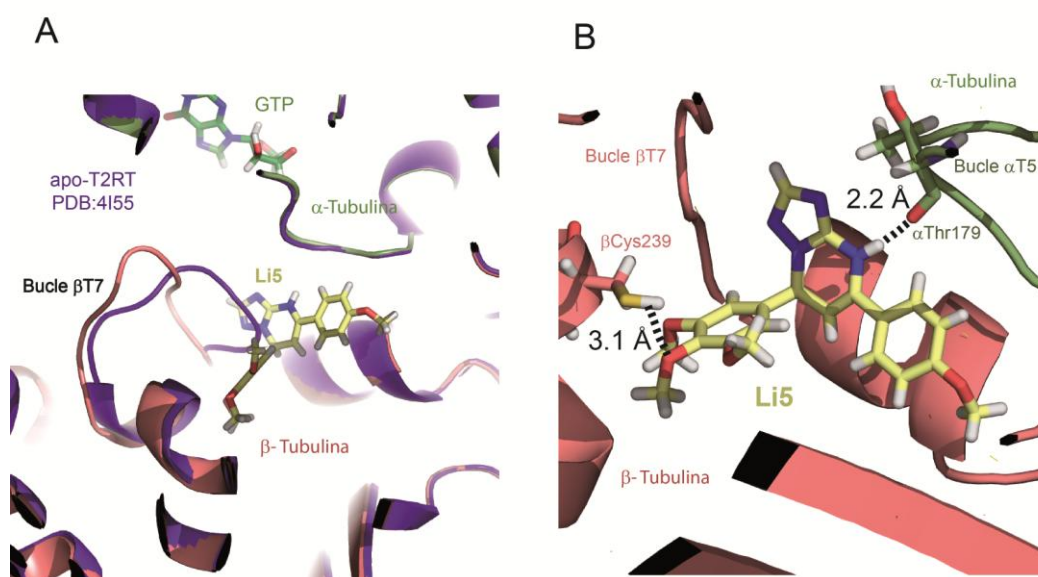


Figura 43: A). Vista en detalle del sitio de unión del Li5 donde se observa el desplazamiento del bucle β T7 al superponer la estructura con la forma apo-T2RT (PDB 4I55). **B)** Detalle del sitio de unión del Li5 en la interfaz intradimérica donde se observan los dos puentes de hidrógeno que establece el ligando con la β Cys239 y la α Thr179.

4.1.12. Análisis bioinformático de las interacciones de los ligandos con la tubulina

Puesto que en la estructura cristalográfica se observa la importancia de la interacción del Li5 con la Thr179 de la subunidad α y con la Cys241 de la subunidad β , se realizó una simulación de dinámica molecular para ver la distribución de estas interacciones a lo largo de 5ns, así como la posibilidad de que aparezcan interacciones lábiles transitorias que tengan relevancia en la interacción proteína-ligando. Se pudo ver que la interacción con la α Thr179 se produce en un 82% de las veces mientras que la interacción con la β Cys241 solo se produce un 43% (Figura 44A y B). Además de dos puentes de hidrógeno observados en la estructura cristalográfica, el anillo triazolo establece una interacción hidrófoba un 62% del tiempo con la β Lys 254.

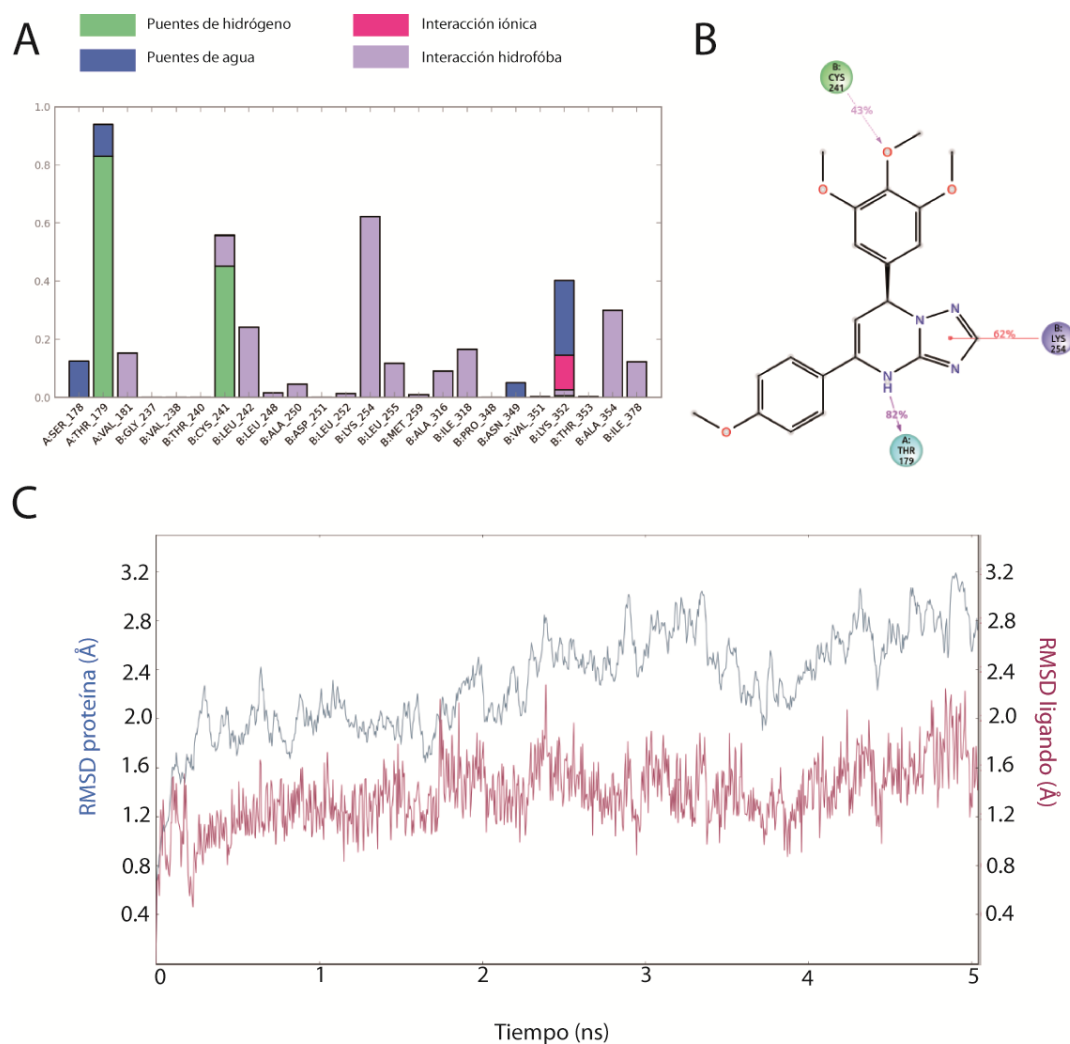


Figura 44: Simulación de dinámica molecular del complejo T2RT-Li5. **A)** Cuantificación de las interacciones del Li5 con la proteína a lo largo de la simulación. **B)** Diagrama de interacción del ligando con la proteína, donde se muestran las tres interacciones mayoritarias, dos puentes de hidrógeno (β Cys239 y α Thr179) y una interacción hidrofóba (β Lys254). **C)** RMSD de la proteína durante la simulación (línea azul), RMSD del ligando durante la simulación (línea roja). El valor de RMSD se calcula a cada tiempo entre la conformación final y la conformación de partida.

Mediante la técnica de acoplamiento molecular se procedió a elucidar la orientación de los análogos XH5094 y XH5085-3 en el dímero de tubulina, utilizando como control la estructura obtenida por cristalografía. También se realizó el docking del enantiómero R y de la forma oxidada XH5032 como controles negativos. Tras realizar las 250 iteraciones y agruparlas según su energía de unión, se observó que tanto la forma R como la oxidada presentan una distribución de poses mucho más heterogénea que los compuestos activos y además tienen una energía de unión más baja. En cuanto a los compuestos activos, la mayor parte de las iteraciones dan como resultado una pose mayoritaria de mayor energía de unión (Figura 45).

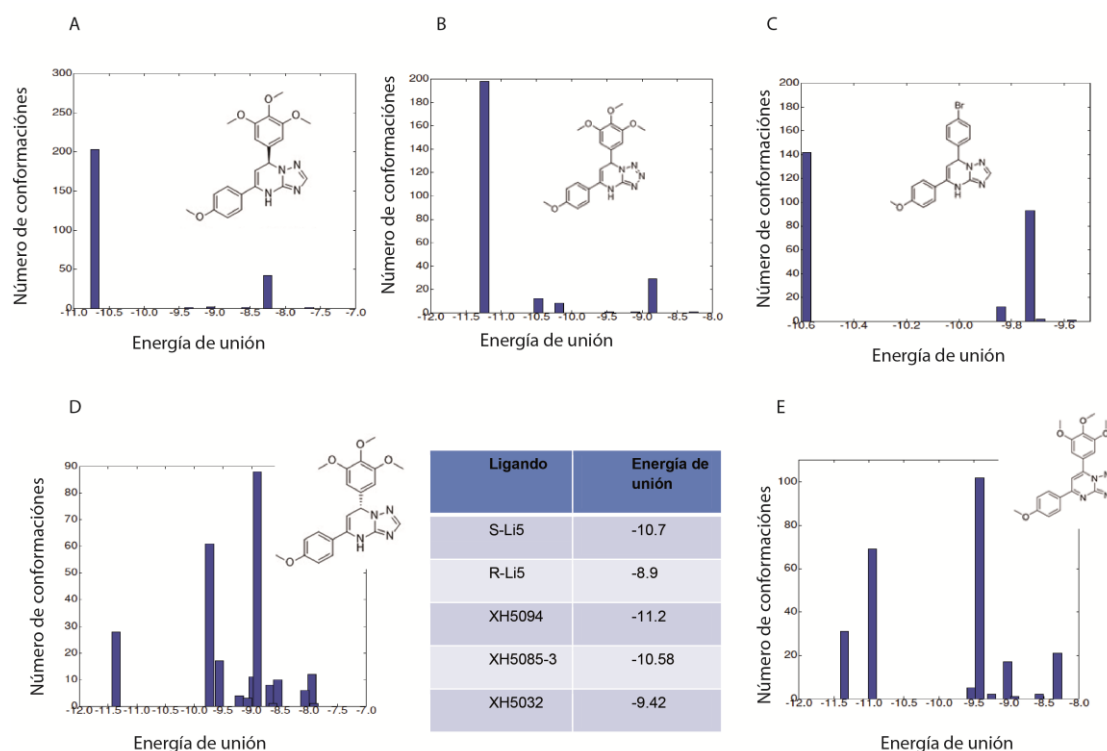


Figura 45: Agrupación de las diferentes poses correspondientes a las iteraciones realizadas durante el docking, dicha agrupación se hace en relación a la energía de unión de cada pose. **A)** S-Li5, **B)** XH5094, **C)** XH5085-3, **D)** R-Li5 y **E)** XH5032. En la tabla se muestra la energía de unión de la pose mayoritaria de cada ligando.

Al solapar la estructura resultante de las poses mayoritarias de cada ligando con la estructura del S-Li5 obtenida mediante cristalografía de rayos X, se puede observar como la pose de mayor energía de los tres ligandos activos coincide con la del cristal (Figura 46B). Sin embargo, al solapar la pose mayoritaria del R-Li5 y del XH5032, se observó como la disposición de los ligandos no es similar a la del Li5 ni a la de otros ligandos del sitio de colchicina (Figura 46A).

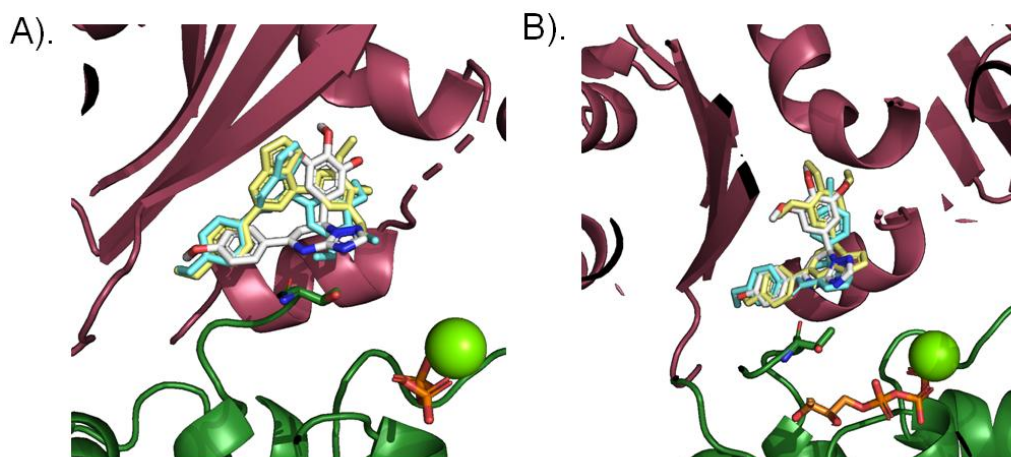


Figura 46: Solapamiento de las poses mayoritarias obtenidas por docking de cada ligando con la estructura cristalográfica. La estructura de la forma S del Li5 se presenta en color blanco. **A).** Superposición con los ligandos XH5032 (amarillo) y la forma R del Li5 (cian). **B).** Superposición con los ligandos XH5085-3 (cian) y XH5094 (amarillo).

4.2. Caracterización de la unión de la ciclostreptina a tubulina

La unión covalente de la ciclostreptina al sitio de taxol en la tubulina fue previamente caracterizada por espectrometría de masas (Buey et al., 2007). Según este trabajo, el compuesto tiene dos sitios de unión posibles, la β Thr220 y la β Asn228, estando el primer residuo localizado en el sitio del poro, que ha sido propuesto como el sitio de entrada de los ligandos del sitio de taxol. Puesto que el compuesto posee unión covalente, representa una oportunidad única de determinar la estructura de un complejo proteína-ligando de un taxano en el llamado sitio del poro, ya que el paso de los compuestos por esta zona es transitorio. Por ello se procedió a caracterizar la unión del compuesto a tubulina dimérica, que ha sido descrito como el estado donde se encuentra el ligando unido a la β Thr220. Además, debido a que la ciclostreptina tiene una capacidad de ensamblaje menor que otros ligandos conocidos del sitio de taxol como la zampanolida, la resolución de la estructura del compuesto unido a la β Asn228, podría permitir la comparación del sitio de unión con el de otros previamente caracterizados, accediendo así entender que mecanismos estructurales condicionan la potencia de ensamblaje.

4.2.1. Caracterización de la unión de ciclostreptina a tubulina dimérica

Para obtener la estructura de la ciclostreptina unida al sitio del poro a través de la Thr220 de la subunidad β , se procedió a caracterizar la unión del compuesto en las condiciones que producen de forma mayoritaria la unión a dicho residuo, es decir, a tubulina dimérica, para así poder poner a punto las condiciones de cristalización. La unión del compuesto a la tubulina es dependiente de magnesio (Figura 47) por lo que inicialmente se usaron tres concentraciones diferentes: 1.5 mM donde la proteína se encuentra en forma dimérica, 3 mM donde se forman ciertos oligómeros y 7 mM donde la proteína tiene un mayor estado de agregación. Los resultados mostraron que a mayor concentración de magnesio, mayor era la interacción de la tubulina con la ciclostreptina. Puesto que nuestro interés era obtener unión a tubulina dimérica, se procedió a buscar unas condiciones de reacción que mejoraran esta unión en condiciones de baja concentración de magnesio, por lo que se probó a incrementar el tiempo de incubación.

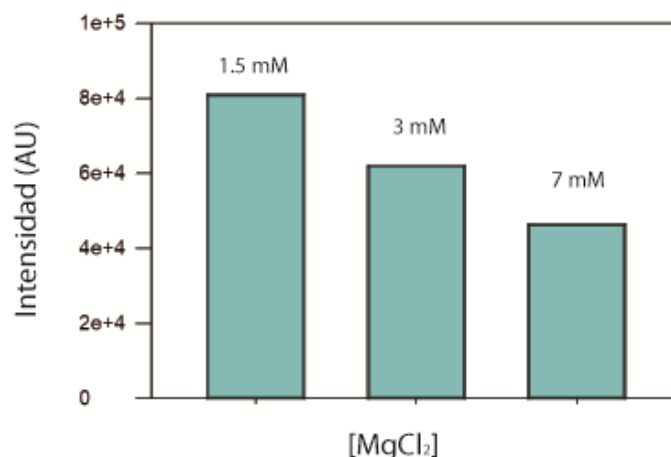


Figura 47: Influencia del MgCl_2 en la unión de ciclosporina a tubulina dimérica en tampón PEDTA, 0.1 mM GTP tras 30 minutos de incubación.

Se incubó así la tubulina con ciclosporina durante cuatro horas y se fueron tomando muestras a diferentes tiempos para determinar el tiempo necesario en el que se produce la reacción completa del ligando con la proteína. Se midieron las muestras mediante HPLC-MS tras ser extraídas con diclorometano, al unirse el ligando de forma covalente a la proteína, tras la extracción solo se detectará aquel ligando que se encuentre libre ya que el unido permanece en la fase acuosa. Se determinó que la reacción se completa en 4 horas a 25 °C (Figura 48A). Puesto que durante tanto tiempo a 25 °C la proteína podría generar algún tipo de agregación, se comprobó mediante microscopía electrónica que las muestras permanecían en forma dimérica (Figura 48B) al final de la reacción.

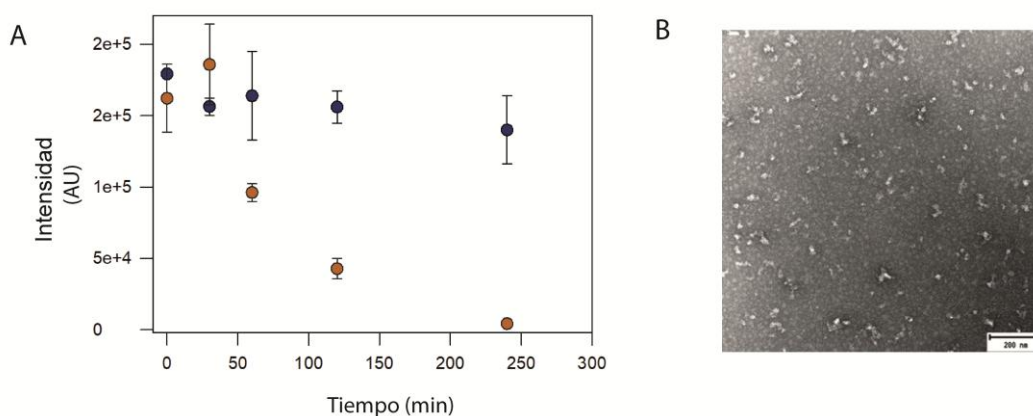


Figura 48: A) Interacción de la ciclosporina con tubulina dimérica (tampón PEDTA 1.5 mM MgCl_2 , 25 °C) a lo largo de 4 horas de incubación cuantificada mediante HPLC-MS. Puntos azules: 25 μM ciclosporina. Puntos naranjas: 25 μM ciclosporina, 20 mM Tubulina. **B)** Micrografía electrónica de la muestra incubada durante 4 horas para observar la ausencia de agregados.

Además, para comprobar la integridad de la proteína tras las cuatro horas, se procedió a inducir el ensamblaje de la tubulina en las muestras incubadas a los diferentes tiempos (Figura 49). Con esto, se vió que la proteína mantiene su actividad tras incubarse cuatro horas con la ciclostreptina a 25°C, por lo que se seleccionó esta condición para la formación del aducto y comenzar así las pruebas de cristalización.

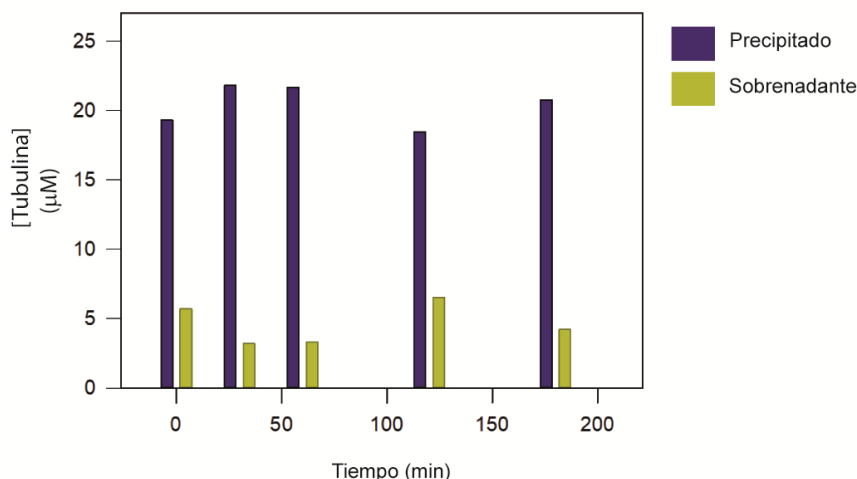


Figura 49: Comprobación de la cantidad de proteína ensamblada tras incubación de tubulina dimérica con ciclostreptina a distintos tiempos (t0, t30 minutos, t1h, t2h y t4h) y posteriormente inducir ensamblaje a 37 °C, 30 minutos.

4.2.2. Determinación de la estructura de los complejos ciclostreptina-tubulina

Para caracterizar la estructura de la ciclostreptina unida a los dos sitios previamente descritos (β Thr220 y β Asn228) se prepararon aductos en dos condiciones diferentes. Para la unión a la Thr220 se utilizó el protocolo descrito en el apartado anterior (20 μ M de Tubulina durante 4 horas a 25 °C), formando el complejo con las proteínas TTL y RB3 tras dicha incubación.

Por otro lado, para obtener la estructura de la ciclostreptina unida a la β Asn228, se prepararon microtúbulos, ya que en estos está descrita como mayoritaria esta reacción. Para ello se incubó la proteína 30 minutos a 37 °C para inducir la polimerización, tras lo cual se añadió 80 μ M de ciclostreptina y se dejó incubando durante 3 horas de forma que se asegurara una interacción total del ligando. Puesto que para realizar la cristalografía es necesario tener la tubulina en forma dimérica, tras la incubación se indujo la despolimerización de los microtúbulos a 4 °C, añadiendo además EDTA y RB3, ya que estos tres factores producen la despolimerización de los microtúbulos.

Las estructuras de estos complejos mostraron que en ambos casos la ciclostreptina se encontraba unida covalentemente a la β His229 (no a la β Asn228) del sitio de taxol y no se encontró ninguna densidad electrónica alrededor de la β Thr220, dándose la interacción únicamente con dicha histidina.

De todos los cristales analizados, el de mejor resolución resultó ser uno correspondiente al aducto formado con tubulina dimérica y fue éste el que se utilizó para resolver la estructura del complejo T2RT-ciclostreptina a una resolución de 1.9 Å (Figura 50A). Se observó densidad electrónica en el sitio de taxol de ambos dímeros del complejo (Figura 50B), la cual se corresponde con ciclostreptina unida de forma covalente a la histidina 229.

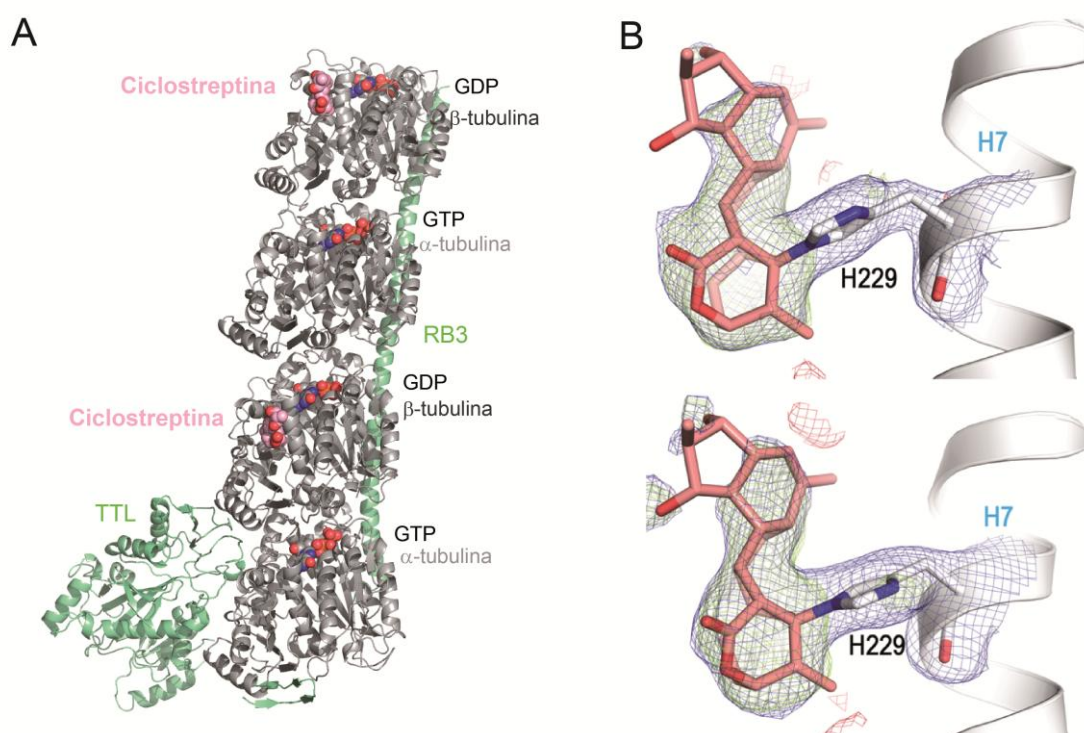


Figura 50: **A)** Vista general del complejo T2R-TTL-Ciclostreptina. Se muestran las moléculas de ciclostreptina en ambas subunidades β mediante modelo de bolas en rosa. Los nucleótidos se muestran en modelo de bolas en azul. **B)** Mapas de densidad electrónica de las dos moléculas de ciclostreptina unidas a la tubulina en las cadenas B (arriba) y D (Abajo et al.).

Dentro de las interacciones no covalentes del ligando con la proteína no se observa ningún puente de hidrógeno ni interacciones salinas. Se producen contactos hidrofóbicos entre los grupos metilo del C7, C22 y C28 de la ciclostreptina y los residuos Asp226, Leu217, Ala233, así como entre el anillo E de la ciclostreptina y la Leu371 (Figura 51).

La estructura del complejo cristalográfico fue superpuesta con la del complejo en ausencia de ligando (PDB 4I55) mostrando un valor de r.m.s.d. de 0.415 Å sobre 2062 átomos. Aunque el plegamiento global es igual que el de la forma apo-GDP, en la subunidad beta superior (la cual esta expuesta y sin contactos cristalinos próximos) se observa como el bucle T5 (sitio de unión de nucleótido) presenta una conformación típica de tubulina unida a GTP (PDB 5XP3), a pesar de que el nucleótido se encuentre unido a GDP (Figura 51).

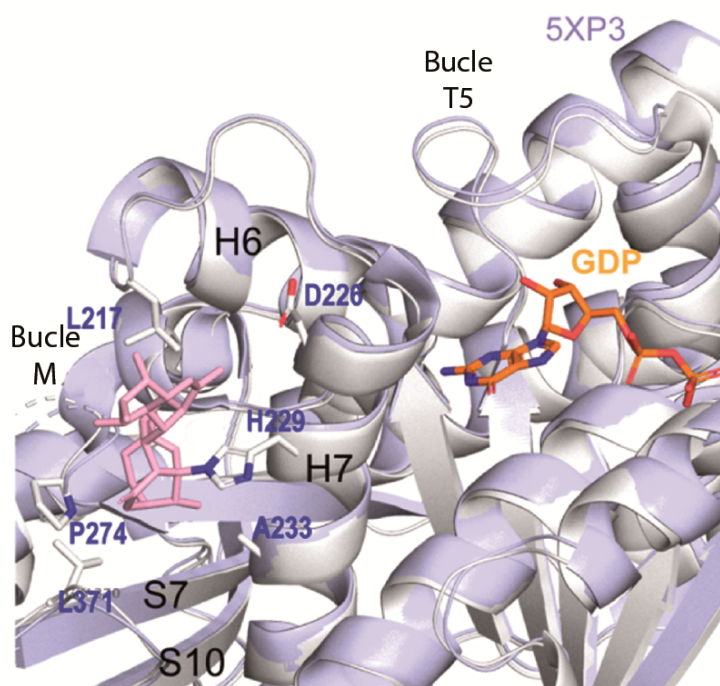


Figura 51: Detalle del sitio de unión de la ciclostreptina a la subunidad β de la tubulina. Se remarcan aquellos residuos que intervienen en las interacciones hidrofóbicas no covalentes, así como la His229 con la que se produce la unión covalente. Se puede observar como la conformación del bucle T5 es la misma que la de la tubulina unida a GTP (PDB:5XP3).

Hasta el momento, el mecanismo de reacción de la ciclostreptina era desconocido, aunque existían tres posibles mecanismos de reacción propuestos (Buey, 2007 #35272). La determinación de la estructura cristalográfica nos ha permitido comprender cual es el mecanismo real (Figura 52). Tanto la acilación de un nucleófilo a través del carbono C1 como la adición de un nucleófilo al C17 podrían ser dos mecanismos razonables para que se produjera un enlace covalente, siendo la His229 en este caso el nucleófilo. Ambos ataques nucleofílicos determinarían la pérdida del doble enlace en el alqueno C2-C17. La densidad electrónica encontrada en nuestra estructura cristalográfica nos permite establecer que la reacción con la His229 ocurre por la unión del compuesto al C17 a través de una adición 1,4 del nitrógeno de la cadena lateral de la histidina seguida de una protonación del enolato formado. Esto se correlaciona con datos previos donde se determinó el doble enlace C2-C17 como requerimiento estructural para la actividad de la ciclostreptina.

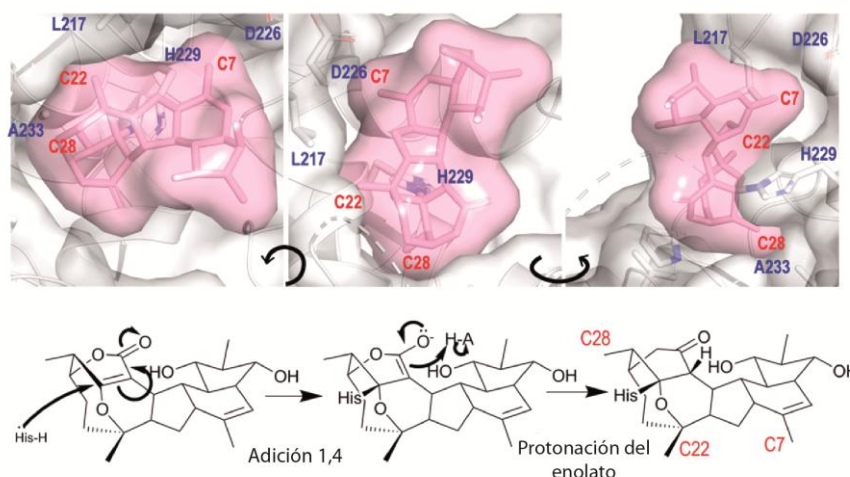


Figura 52: Mecanismo de reacción de la ciclostreptina con la β His229. Arriba se muestra la ciclostreptina unida a la His229 en tres orientaciones diferentes marcando en rojo varios carbonos de la molécula para facilitar la visualización. Abajo se muestra el mecanismo de reacción, el cual sucede en dos etapas.

4.2.3. Determinación de la unión de la ciclostreptina por espectrometría de masas (MS/HPLC)

Puesto que los estudios previamente realizados por espectrometría de masas mostraban la interacción de la ciclostreptina con β Thr220 y β Asn228, y mediante cristalografía solo se ha visto unión a la His229, se procedió a analizar de nuevo la muestra del aducto mediante espectrometría de masas. Para ello se incubó la muestra en las mismas condiciones utilizadas para realizar el complejo cristalográfico y se digirieron las muestras con tripsina para su posterior análisis tal y como está descrito en el apartado de los métodos. En este caso se encontró la ciclostreptina unida a la His229 en un péptido triptico que contiene la secuencia β 219-243 LTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLR (Figura 53). Puesto que este residuo es contiguo al residuo Asn228 previamente caracterizado y teniendo en cuenta que la resolución del triple cuadrupolo híbrido utilizado para las determinaciones previas era más baja, cabe pensar que el resultado fue artefactual debido a un error en la asignación de los diferentes iones ya que las señales utilizadas para determinar el sitio de unión poseían una intensidad menor.

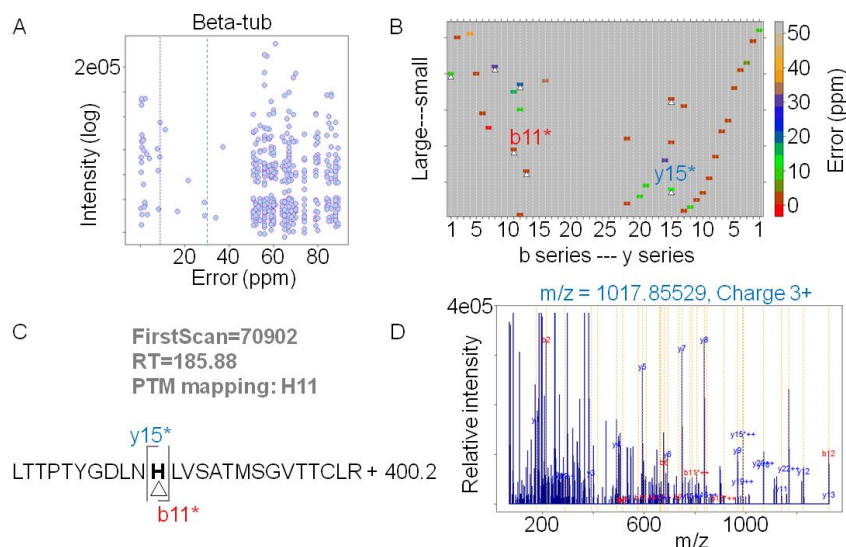


Figura 53: Análisis por espectrometría de masas del aducto tubulina-ciclostreptina **A)** y **B)** Resultado del péptido triptico derivado del aducto ciclostreptina-tubulina abarcando la secuencia LTTPTYGDLNHLVSATMSGVTCLR. **C)** Posición exacta de la modificación debida a la ciclostreptina, se localizó la masa correspondiente a la ciclostreptina (402.2 Da) en el residuo H11 del péptido triptico. **D)** Espectro de fragmentación mostrando los diferentes fragmentos asignados.

La mejora de la resolución de los picos ha permitido incrementar en los últimos años la sensibilidad y la especificidad en la caracterización. Teniendo en cuenta además, que la His229 es un residuo más reactivo, más accesible en el sitio de unión y que es responsable de la unión covalente de la zampanolida, podemos asumir que los resultados previamente obtenidos eran artefactuales, al menos para la Asn228. Respecto a la Thr220, no podemos descartar que la ciclostreptina interaccione con este residuo en el poro, pero debido a que no ha sido posible detectarse ni por cristalografía ni replicar mediante espectrometría de masas su unión, debemos asumir que de existir esta interacción debe ser transitoria y por tanto no covalente.

4.2.4. Comparación de la capacidad de ensamblaje de los ligandos covalentes del sitio de taxol

Puesto que la teoría más aceptada es que el ensamblaje de los microtubulos esta favorecido por ligandos del sitio de taxol a través de la estructuración del bucle M en tubulina no ensamblada, y debido a que hemos observado una ausencia de estructuración de dicho bucle con la unión de ciclostreptina, se procedió a medir la capacidad de ensamblaje de los tres ligandos covalentes del sitio de taxol conocidos hasta el momento (ciclostreptina, zampanolida y taccalonolida AJ). Para ello se utilizó condiciones en las cuales la tubulina carece de capacidad de ensamblaje por si misma, es decir, un tampón fosfato sin glicerol. Puesto que la capacidad de ensamblaje inducida por taxanos es dependiente de la concentración de magnesio (Diaz et al., 1993) se realizó el ensayo utilizando una concentración baja (3 mM $MgCl_2$) y una concentración alta (7 mM $MgCl_2$). A bajas concentraciones de magnesio

se ve como únicamente la zampanolida consigue producir ensamblaje de la tubulina, mientras que tanto la ciclostreptina como la taccalonolida AJ hacen que la proteína permanezca despolimerizada tal como ocurre en el caso de la tubulina en ausencia de ligando (Figura 54A). Sin embargo, a concentraciones altas de magnesio, los tres ligandos producen ensamblaje de la tubulina observándose entre ellos diferencias tanto en el incremento de señal (Figura 54B), el cual está relacionado con la cantidad y tamaño de los microtubulos ensamblados, como en el tiempo que tarda en producirse el ensamblaje, que está relacionado con la etapa de nucleación en el inicio de la polimerización. En el caso de la zampanolida se produce un ensamblaje mayor y más rápido comparando con aquel producido a concentraciones bajas de magnesio. La taccalonolida AJ sin embargo tarda aproximadamente 20 minutos más que la zampanolida en producir ensamblaje, y la intensidad de la señal es prácticamente la mitad que la que se produce con zampanolida. Por último, en el caso de la ciclostreptina se ve como la inducción de la polimerización es incluso más débil, tardando más de 20 minutos y generando un máximo de señal que corresponde a casi la mitad de la generada por la taccalonolida AJ.

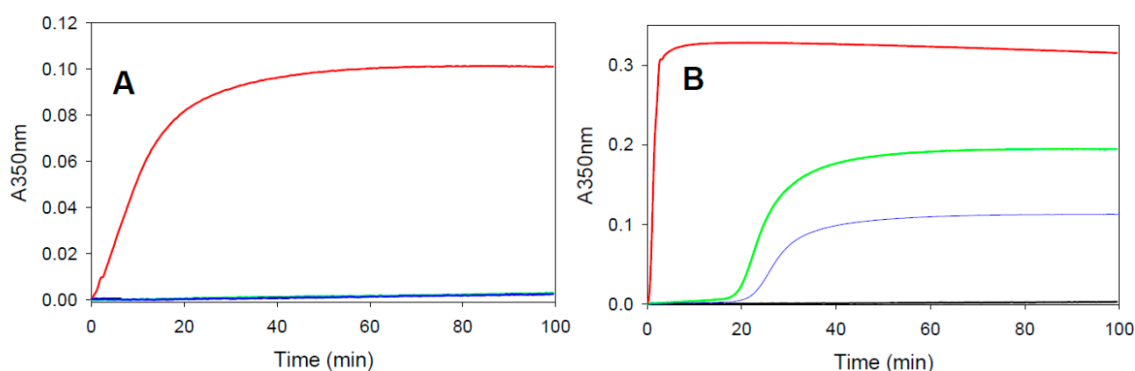


Figura 54: Curva de ensamblaje de 25 μM de tubulina en tampón 10 mM NaPi, 1 mM EDTA, 1 mM GTP, pH 7.0 suplementado con 3 mM MgCl_2 (A) o con 7 mM MgCl_2 (B) en presencia de 27.5 μM ciclostreptina (azul), taccalonolida AJ (verde) o zampanolida (rojo) o de DMSO (negro).

4.2.5. Citotoxicidad de los distintos ligandos covalentes en células resistentes a taxol

Para conocer la efectividad de los diferentes ligandos covalentes del sitio de taxol en células resistentes a fármacos dirigidos contra tubulina por sobreexpresión del isotipo βIII , se procedió a medir la citotoxicidad de estos en células HeLa y células HeLa transfectadas con el isotipo βIII (Tabla 10). Como control se utilizó taxol cuyo índice de resistencia comparando las células HeLa con las transfectadas dió un valor de 16.6 tal como cabría esperar ya que estas células son resistentes a taxol. Sin embargo, en el caso de la zampanolida, la taccalonolida AJ y la ciclostreptina, el índice de resistencia calculado es mucho más bajo siendo de 4.9, 1.6 y 2.8 respectivamente. Aunque el índice de resistencia es más bajo que en el caso del taxol, las células siguen manteniendo algo de resistencia a los ligandos, a pesar de que estos son covalentes. Cuando se calcula la citotoxicidad de la pironetina en estas células, al unirse este ligando a la subunidad α de la tubulina, se supera la resistencia de forma

completa, obteniéndose un índice de resistencia de 0.6, siendo las células que sobreexpresan β III incluso más sensibles.

Compuesto	HeLa IC50 (nM)	HeLa β III IC50 (nM)	R/S
Zampanolida	0.045 \pm 0.007	0.22 \pm 0.06	4.9
Ciclostreptina	19.3 \pm 0.3	53.8 \pm 4.3	2.8
Taccalonolida AJ	6.2 \pm 0.3	9.6 \pm 1.2	1.6
Pironetina	6.9 \pm 1.6	3.9 \pm 0.5	0.6
Taxol	1.6 \pm 0.3	25.7 \pm 0.1	16.6

Tabla 10: Valores de IC50 (nM \pm error estándar) de los diferentes ligandos covalentes y del taxol en células HeLa y células HeLa resistentes a taxol por sobreexpresión del isotipo β III

5

Discusión

5.1. Análisis del compuesto Li5 y sus derivados

Los agentes dirigidos a tubulina constituyen una de las principales dianas antitumorales debido a la variedad de procesos en los que interviene esta proteína, constituyendo así antitumorales de amplio espectro. En la naturaleza hay gran cantidad de estos compuestos debido a su utilización por parte de los organismos que los producen como mecanismo de defensa frente a depredadores. De éstos, los ligandos del sitio de colchicina presentan una gran variedad de estructuras químicas, por lo que éste es uno de los sitios de unión más versátiles (Li et al., 2017). Algunos fármacos de este sitio de unión se utilizan en clínica para el tratamiento de ciertas enfermedades: podofilotoxina, se utiliza en tratamiento de infecciones por papilomavirus (Murray et al., 2018); colchicina, empleada con regularidad para el tratamiento de la gota (Morgan, 2008); y mebendazol, esencial como antihelmíntico (Moliner et al., 2011). Aún así, hasta ahora ningún fármaco frente a este sitio se ha llegado a comercializar como agente anticancerígeno, en parte debido a la gran toxicidad que poseen algunos de estos compuestos. Sólo algunos se encuentran en fase avanzada de ensayos clínicos, como lexibulina (Burge et al., 2013) y plinabulina (Millward et al., 2012). Por este motivo, resulta interesante encontrar nuevos ligandos dirigidos a dicho sitio, así como entender que mecanismos estructurales están implicados en la unión a la diana, para diseñar nuevos fármacos que puedan utilizarse en clínica.

5.1.1. Li5 es un compuesto con actividad antimetabólica dirigido contra el sitio de colchicina en tubulina

En el presente trabajo se ha analizado un nuevo tipo de ligandos dirigidos contra tubulina, que comparten algunos motivos estructurales con otros compuestos ya conocidos. Se comenzó cribando mediante ensayos de citotoxicidad 28 ligandos con quimiotipo similar; todos los ligandos poseen un anillo central de triazolopirimidina y dos anillos de fenilo, difiriendo unos de otros en los sustituyentes en los anillos fenilo y triazolo, así como en el estado de oxidación del anillo de pirimidina. De éstos sólo se encontraron tres con actividad citotóxica, siendo el denominado Li5 el más interesante ya que presentaba una elevada toxicidad en todas las líneas celulares estudiadas.

Se ha visto que el compuesto Li5 produce parada del ciclo celular, generando acumulación de células en fase G₂/M, lo cual es típico de los compuestos antimitóticos ya que impiden que se termine la mitosis. El efecto en células es debido a una completa despolimerización del citoesqueleto tal y como muestran los ensayos de inmunofluorescencia indirecta. A 100 nM ya se observaba una completa ausencia de microtúbulos en interfase junto con mitosis anormales. Ensayos bioquímicos y biofísicos corroboraron que tubulina es la diana del compuesto *in vitro*. Y estudios de desplazamiento y sobre todo la resolución de la estructura cristalográfica del complejo proteína-ligando, nos permiten afirmar que el sitio de unión es el de colchicina. De hecho, Li5 presenta la constante de unión es más alta que se conoce de ligandos del mismo sitio hasta la fecha.

Por tanto, el mecanismo de acción de Li5 es a través de la despolimerización de microtúbulos, constituyendo por tanto un nuevo agente desestabilizante de microtúbulos (MDA). Li5 produce despolimerización a concentraciones bajas (hasta 2 μ M) pero además induce la formación de polímeros anómalos (no microtubulares) a concentraciones altas (por encima de 10 μ M) de forma similar a lo previamente descrita con la colchicina (Andreu and Timasheff, 1982).

5.1.2. La actividad del Li5 depende de su estado redox a través de la conformación del C7

Dentro de los ligandos analizados en este trabajo, XH5032 es el que posee mayor similitud estructural con el Li5. Ambos difieren en el estado de oxidación del anillo de pirimidina, que se encuentra reducido en el Li5 y oxidado en el XH5032. En los ensayos celulares se vió una baja toxicidad del XH5032 con respecto al Li5. A la hora de determinar su efecto sobre el ciclo celular se comprobó que era necesaria una concentración 200 veces mayor para producir la parada en G₂/M, por lo que el estado redox, debe afectar a la unión del ligando.

En una primera aproximación se vió que sólo un cincuenta por ciento del ligando se unía a tubulina, lo cual no se correlacionaba con la elevada actividad medida a nivel celular. Mediante dicroísmo circular se determinó que el ligando utilizado corresponde efectivamente a una mezcla racémica y que la forma S-Li5 y R-Li5 presentan espectros de dicroísmo circular simétricos. Este resultado nos indicó que los compuestos solo difieren en la configuración del carbono quiral (C7) presentando las mismas propiedades físicas pero distinta actividad biológica.

La estructura a alta resolución del complejo T2RT-Li5 mostró inequívocamente que la forma activa que se une a la diana es la correspondiente al enantiómero S. Utilizando la estructura obtenida, se superpuso tanto el compuesto oxidado XH5032 como el enantiómero con configuración R (Figura 55) con el objeto de analizar el fundamento de la pérdida de actividad de estos compuestos en los ensayos celulares e *in vitro*. La configuración recta de la molécula del XH5032 hace que el anillo trimetoxifenil se encuentre alejado de la hélice β H7 impidiendo así la interacción con la β Cys239 (Figura 55A). Al encontrarse oxidado el anillo de pirimidina, no hay hidrogenación en el nitrógeno en posición 4 del anillo, aumentando así la distancia con la treonina que pasa de ser de 2.2 Å en el caso del Li5 a 3 Å en el caso del XH5032, lo que dificulta que se pueda establecer esta interacción. Este compuesto presenta algo de toxicidad en células (CI50 en la línea A549 es de 19 μ M) frente a otros ligandos de

la serie que presentan valores por encima de $50\mu\text{M}$. Probablemente, XH5032 retiene la capacidad de unirse a tubulina, pero la ausencia de interacción con la cisteína y el aumento de la distancia con la treonina hacen que la unión sea mucho menor. Por otro lado, en la forma enantiomérica R (Figura 55B) se observa como el anillo trimetoxifenil se dispone en una conformación que genera impedimentos estéricos con la hélice βH8 de acceso al sitio de unión. Los ensayos computacionales de acoplamiento molecular dieron como resultado una gran heterogeneidad en las poses encontradas tanto para el XH5032 como para el enantiomero R. La pose mayoritaria de ambos compuestos era parecida pero difería considerablemente de la conformación de unión de Li5, así como de la de otros ligandos del sitio de colchicina de estructura conocida (ver apartado 4.1.12 resultados). Además, las energías de unión de las poses mayoritarias para estos dos ligandos resultaron más desfavorables que para los ligandos activos.

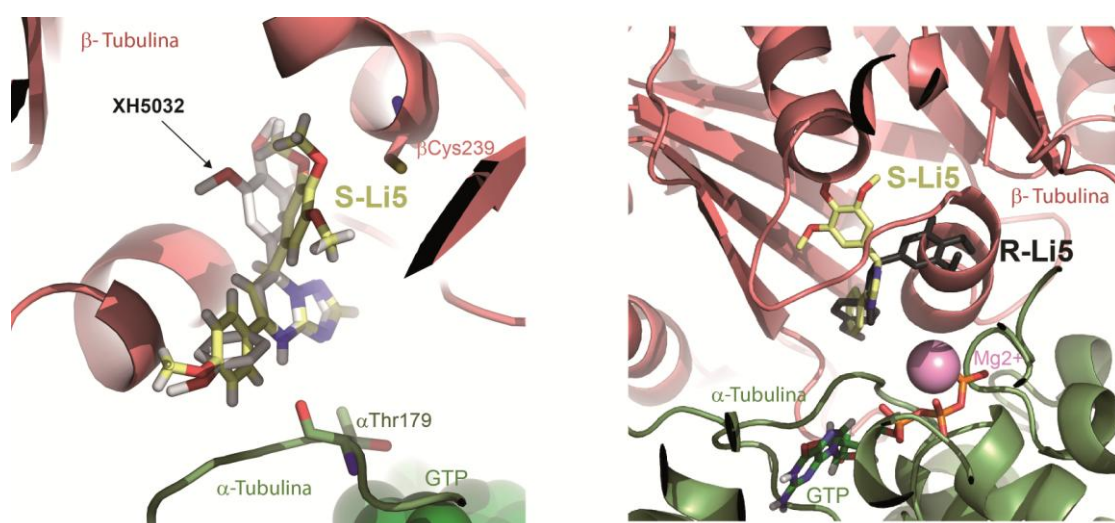


Figura 55: A) Superposición del compuesto XH5032 con la estructura cristalográfica del complejo T2RT-Li5. B) Superposición del enantiómero R con la estructura del complejo T2RT-Li5.

5.1.3. El Li5 se une a la tubulina de forma similar a otros compuestos del sitio de colchicina como la podofilotoxina

La gran cantidad de quimiotipos diferentes con unión al sitio de colchicina han permitido determinar como dentro de este sitio hay diferentes regiones o puntos calientes de interacción (Dorleans et al., 2009; Li et al., 2017; Wang et al., 2016). Existe una primera región constituida por la zona más cercana a la subunidad α , alrededor del bucle αT5 , una región intermedia localizada en la proximidad a la hélice βH7 y una tercera región que se encuentra más internamente dentro del bolsillo en la subunidad β . Aunque la mayor parte de ligandos del sitio interaccionan con la segunda región intermedia, algunos como la colchicina interaccionan con la primera región y no con la tercera (Niu et al., 2017; Ravelli et al., 2004), mientras que otros como el nocodazol se disponen más profundamente en la subunidad β e interaccionan con la segunda y tercera región, pero no con aquella más próxima al bucle αT5 (Bueno et al.,

2018; Sharma et al., 2017; Wang et al., 2016). En este contexto se superpuso la estructura de Li5 obtenida por cristalografía con las de otros ligandos del sitio de colchicina y se vió que Li5 ocupa la primera y segunda región, siendo su modo de unión más próximo al de la podofilotoxina, la combretastatina A4 o la colchicina que al de los ligandos con quimiotipo más cercano al del nocodazol (Figura A).

La unión de los ligandos al sitio de colchicina produce un desplazamiento del bucle β T7 que se mueve hacia abajo para poder acomodar al ligando, y en muchos casos también un desplazamiento del bucle α T5 (Prota et al., 2014c; Sharma et al., 2017). La comparación de la estructura de Li5 con la del complejo T2RT sin ligando (PDB:4I55) pone de manifiesto el desplazamiento del bucle β T7 en presencia de Li5, pero no se aprecia ningún movimiento del bucle α T5 (como en los complejos proteína-ligando de podofilotoxina (PDB:1SA1) y de demetilepipodofilotoxina (PDB:5XLT)). El desplazamiento de este bucle se produce en ligandos con grupos funcionales más voluminosos en esta región, como ocurre con la colchicina cuyo grupo acetamida induce el movimiento del bucle (Figura 56B).

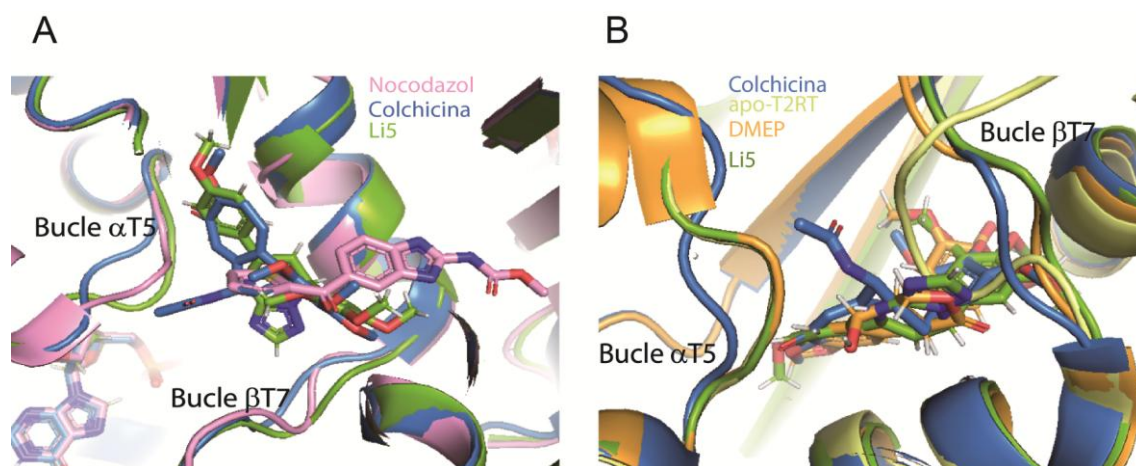


Figura 56: A). Superposición de la estructura del complejo tubulina-Li con otros complejos proteína ligando del sitio de colchicina. Se muestra el nocodazol y la colchicina, observándose la amplitud del sitio de unión. El Li5 ocupa una zona similar a la de colchicina y otros ligandos como la podofilotoxina. **B).** Superposición de la estructura de la tubulina-Li5 con la de la colchicina (PDB:4O2B), demetilepipodofilotoxina (PDB:5XLT) y con la estructura del complejo T2RT sin ligando (PDB:4I55) donde se ve como se desplaza el bucle β T7 hacia fuera pero el bucle α T5 permanece igual que en la forma apo, tal como ocurre con la DMEP.

5.1.4. Las interacciones con la β Thr179 y la β Cys239 son esenciales para la actividad del Li5

La estructura cristalográfica del complejo Li5-tubulina pone de manifiesto que la principal interacción es un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del anillo de triazolopirimidina y la Thr179 de la subunidad α de la tubulina. Este residuo se encuentra situado en el bucle T5 de la subunidad α y se ha descrito como una interacción importante en otros ligandos del sitio de colchicina. De hecho, se ha visto que determinadas modificaciones en podofilotoxina favorecen la interacción y mejoran considerablemente la afinidad de los derivados por tubulina. Esto ocurre con el 4'-demetilepipodofilotoxina (DMEP) donde el epímero hace que el grupo hidroxilo del C4 se encuentre más cerca de la Thr179 generando un puente de hidrógeno con esta (Niu et al., 2017). También la adición de un grupo triazolotiol en la posición del C4 de la podofilotoxina aumenta considerablemente la afinidad con respecto a la de podofilotoxina e incluso se genera un cambio conformacional en el bucle T5, que se desplaza para acomodar el triazolotiol (Zhao et al., 2017). Aunque no todos los ligandos del sitio de colchicina tienen una fuerte interacción con el bucle T5 de la subunidad α (Sharma et al., 2017; Wang et al., 2016), sí que parece que esta unión favorece considerablemente la afinidad y el efecto de los compuestos. Por otro lado se observa otro puente de hidrógeno menos fuerte entre el oxígeno del grupo metoxi central del anillo trimetoxifenil con la Cys239 de la hélice H7 de la subunidad β . El anillo trimetoxifenil es un motivo estructural presente en la colchicina, así como en muchos otros ligandos que se unen al mismo sitio de unión como la podofilotoxina o la combretastina A4 (Jaroch et al., 2016; Li et al., 2018). La interacción de ligandos con esta cisteína también ha sido descrita en otras estructuras cristalográficas como la del nocodazol.

EL estudio computacional de acoplamiento molecular en los otros dos ligandos activos (XH5085-3 y XH5094) mostró que la pose mayoritaria para ambos coincide con la conformación de Li5 en el cristal (Figura 57). La única diferencia de XH5094 con respecto al Li5 es un anillo tetrazolo en lugar del anillo triazolo. Aunque en el cristal no se aprecia ninguna interacción de esta región con la proteína, en la simulación de dinámica molecular con Li5 se ve que este anillo establece contactos hidrofóbicos con la lisina 254, por lo que la presencia de un nitrógeno extra podría disminuir la hidrofobicidad de esta región y perjudicar dicho contacto. Además la superposición de la pose mayoritaria obtenida en el acoplamiento molecular con la estructura del complejo T2RT-Li5 muestra que el anillo de pirimidina se encuentra algo más alejado de la treonina 179 (de 2.2 Å a 2.8 Å), generándose un puente de hidrógeno más débil.

El compuesto XH5085-3 difiere estructuralmente de Li5, desapareciendo los tres grupos metoxi del trimetoxifenil, estando el metoxi central sustituido por un átomo de bromo. La superposición de la pose mayoritaria de la simulación con la estructura del cristal muestra que este cambio produce un aumento de distancia la distancia para la formación el puente de hidrógeno con la cisteína (de 3.1 Å a 3.8 Å).

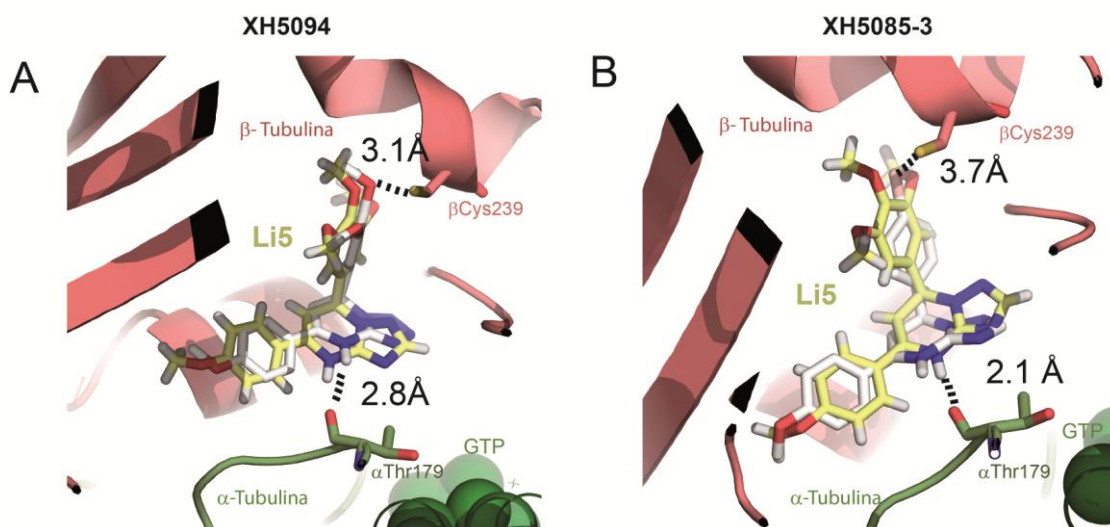


Figura 57: Interacción de la pose mayoritaria del compuesto XH5094 **(A)** y XH5085-3 **(B)** obtenida en el docking con la tubulina mediante superposición de dichas poses con la estructura cristalográfica del complejo T2RT-Li5.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la base molecular de la ausencia de actividad citotóxica de gran parte de los ligandos analizados en el cribado inicial. La orientación necesaria para establecer la interacción proteína-ligando requiere de la configuración tetrahédrica del C7, lo cual no ocurre en la mayor parte de los ligandos debido al estado de oxidación del anillo de pirimidina (Figura). De los que si poseen dicha configuración en el C7, solo tres de ellos resultaron activos, mientras que seis carencian de actividad, muy probablemente porque las modificaciones en el anillo trimetoxifenil son incompatibles con la interacción de la β Cys239 o los grupos funcionales son muy voluminosos generando impedimentos estéricos.

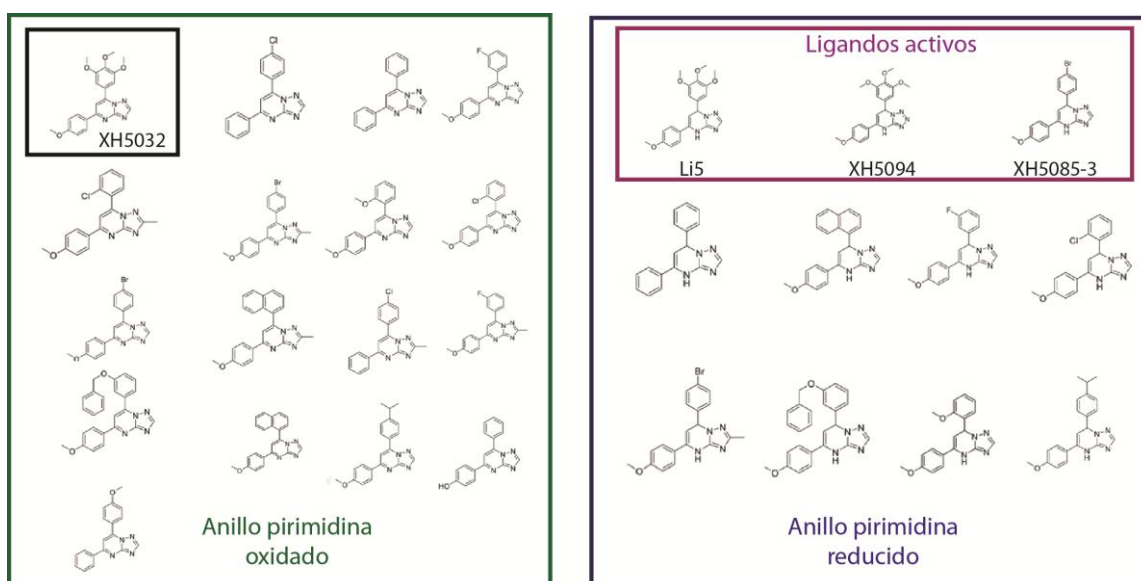


Figura 58: Clasificación de los ligandos analizados en el cribado inicial. La mayor parte de ellos poseen el anillo de pirimidina en forma oxidada siendo por tanto inactivos al igual que ocurre con el XH5032. De los que poseen el anillo reducido, se puede ver como todos los que son

Por otro lado, la elevada actividad del Li5 y su unión dependiente del estado redox, determinan la importancia de este ligando como candidato para posteriores estudios clínicos. La posibilidad de modificar la actividad de un compuesto según su estado de oxidación permite utilizarlo de forma dirigida hacia ambientes donde se produzca un ambiente reductor que determine la activación del ligando (Klaunig, 2019). Además, la oxidación del ligando en el hígado por el citocromo P450 o por otras oxidasas podría permitir la inactivación del compuesto remanente eliminando así posibles efectos adversos de toxicidad cruzada.

Nuestros colaboradores del Weill Cornell Medicine Center (Nueva York, USA) realizaron ensayos tanto de toxicidad como de actividad antitumoral en ratones. Para determinar la toxicidad del Li5 se monitorizó el cambio de peso en ratones C57/BL6 (Figura A) tras la administración de 5mg/kg durante los días de duración del ensayo y se comprobó mediante cortes histológicos el efecto en diferentes órganos (Figura 60B). Para analizar actividad antitumoral de Li5 en ratones se realizaron xenotransplantes utilizando líneas celulares OCLI-Ly7 procedentes de linfomas DLBCL (linfomas difusos de células B grandes) y se determinó el tamaño del tumor a lo largo de quince días. Fue sorprendente descubrir que a diferencia de la mayoría (si no todos) de los ligandos del sitio de colchicina, la administración del Li5 no produjo efectos tóxicos en los ratones. Además, la administración del compuesto indujo una disminución considerable del crecimiento tumoral comparando con ratones controles (tratados con DMSO) (Figura 60C). La baja toxicidad presentada por el ligando, así como el mantenimiento de su actividad antitumoral en ratones, posicionan al Li5 como un compuesto susceptible de posteriores ensayos clínicos.

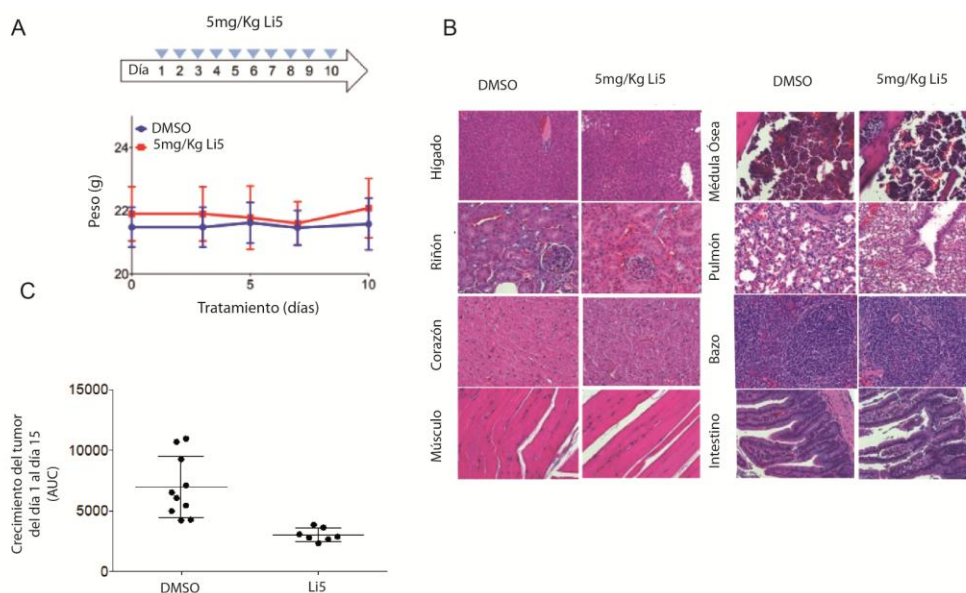


Figura 60: Efecto del Li5 en ratones C57/BL6. **A)** Monitorización del peso de los ratones a lo largo de diez días de tratamiento en comparación con ratones tratados con DMSO. **B)** Efecto del Li5 en cortes histológicos de diferentes tejidos. **C)** Disminución del tamaño del tumor en ratones con xenotransplantes de células OCLI-Ly7.

5.2. Análisis del efecto de compuestos covalentes del sitio de taxol

La ventaja desde el punto terapéutico de los compuestos que se unen a tubulina de forma covalente radica en disminuir la susceptibilidad a ser expulsados de la célula por la glicoproteína-p o por algún otro transportador de membrana implicado en procesos de detoxificación, permitiendo de este modo superar el que hasta ahora es el principal mecanismo descrito en clínica de resistencia a quimioterapia (Field et al., 2017). Dentro de los antitumorales dirigidos contra tubulina es destacable el uso de maytansina y auristatina conjugadas a anticuerpos para dirigir los fármacos directamente a células tumorales. El desarrollo de este tipo de fármacos conjugados a anticuerpos (ADCs) requiere de ligandos con una alta afinidad o que se unan de forma covalente para contrarrestar las bajas concentraciones que se liberan al tumor utilizando estos métodos (Bouchard et al., 2014; Sau et al., 2017).

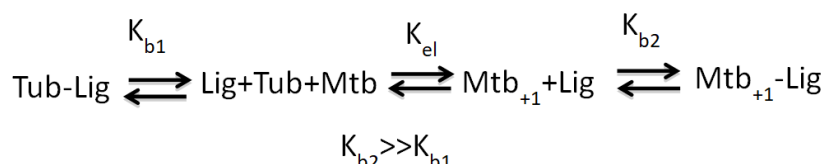
Por el momento se conocen cuatro compuestos que se unen de forma covalente a la tubulina modulando la dinámica de polimerización microtubular, por un lado pironetina (cuya unión se produce en la interfaz intradimérica) y por otro, tres ligandos conocidos con unión al sitio de taxol: zampanolida, ciclostreptina y taccalonolida AJ (así como su análogo la taccalonolida AF). El diseño de nuevos compuestos que puedan unirse de forma covalente requiere entender el mecanismo de unión de los compuestos que conocemos (estructurales y termodinámicos).

5.2.1. La ciclostreptina se une de forma covalente a la β His229

La estructura a alta resolución del complejo T2RT-ciclostreptina nos han permitido caracterizar el mecanismo de interacción para la formación de la unión covalente del compuesto con la histidina 229 de la subunidad β . Esto contradice la hipótesis previa que establecía que el ligando se unía a la β Asn228 y a la β Thr220 (Buey et al., 2007), basándose en datos de espectrometría de masas. El objetivo inicial fue el de analizar el mecanismo de entrada del ligando al sitio de taxol y posterior unión covalente, por ello se cristalizó el aducto unido a tubulina dimérica y unido a microtúbulos. Los resultados tanto de cristalografía, como el nuevo análisis de espectrometría de masas realizado a mayor resolución, han mostrado una única vía de interacción a través de la histidina 229 (aunque no se puede descartar contactos iniciales con T220). Este resultado concuerda con el hecho de que la β Asn228 tiene un papel clave en la estabilización del nucleótido del sitio E a través de la formación de dos puentes de hidrógeno. La unión de la ciclostreptina a la Asn228 perturbaría la unión del nucleótido (Field et al., 2018). No hemos encontrado evidencias de unión a la β Thr220, localizada en el sitio del poro en los microtúbulos, mediante espectrometría de masas. Esto puede deberse fallos de detección por el analizador de masas y la ausencia de densidad en el cristal podría estar ocasionada por una mayor interacción con la histidina generando una baja ocupación en la región de la treonina. Sin embargo, la ausencia de unión por ambos métodos permiten concluir que esta unión, si se produce, debe ser lábil y transitoria.

5.2.2. La ciclosotrepina no produce estructuración del bucle M

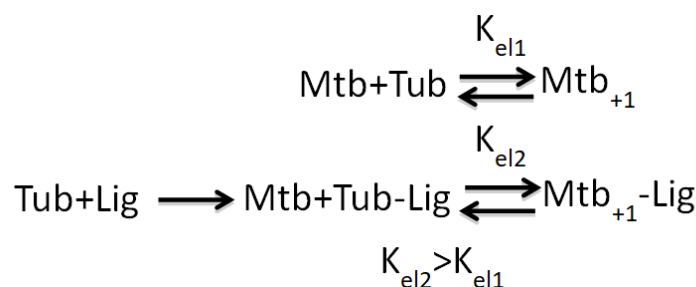
A nivel termodinámico, el efecto de los compuestos no covalentes se basa en diferencias de afinidad entre tubulina ensamblada en microtúbulos y tubulina no ensamblada (esquema 1), de manera que estos ligandos, al poseer una afinidad mayor por la tubulina polimerizada (K_{b2}) que por la tubulina dimérica (K_{b1}) promueven el desplazamiento del equilibrio hacia la forma ensamblada y disminuyen la concentración de tubulina dimérica (Buey et al., 2004; Diaz et al., 1993).



Esquema 3. Esquema de reacción de los ligandos no covalentes con la tubulina ensamblada y desensablada. Donde Tub-Lig es la tubulina unida al ligando, K_{b1} la constante de unión del ligando al dímero, Lig el ligando libre, Mtb el microtúbulo, K_{el} la constante de equilibrio del dímero con el microtúbulo, Mtb_{+1} el microtúbulo con un dímero extra unido y K_{b2} la constante de unión del ligando al microtúbulo.

A nivel estructural no se conoce aún el motivo de esta diferencia en la afinidad, aunque se piensa que la estructuración del bucle M (formación contactos laterales) es un factor clave para incrementar la afinidad. En los microtúbulos los dímeros de tubulina se encuentran en una conformación recta, y el bucle M está estructurado en una hélice (Nogales et al., 1999), mientras que en los dímeros la conformación es curva y dicho bucle carece de estructuración (Pecqueur et al., 2012). Gracias a estudios estructurales se sabe que en la unión de epotilona (sitio de taxol) a tubulina dimérica, parte de la energía se emplea en la estructuración del bucle M. En los microtúbulos el bucle ya está estructurado, por lo que el valor de energía libre de unión es menor y por tanto la afinidad por esta conformación de tubulina es mayor. Sin embargo, la estructuración del bucle M no es un caso general y existen algunos ligandos no covalentes del sitio de taxol (dictiostatina y el discodermolido (Prota et al., 2017; Trigili et al., 2016)) en los que el bucle M no se estructura tras la unión del ligando. Por lo tanto aún se desconocen todos los factores determinantes de las diferencias de afinidad de los compuestos que se unen al sitio de taxol.

En el caso de compuestos que se unen de forma covalente, no existe una diferencia de afinidad por la forma ensamblada y la desensablada puesto que la reacción es irreversible. La capacidad de unión se debe a la mayor afinidad del aducto de tubulina-ligando (K_{el2}) por el extremo del microtúbulo con respecto al heterodímero sin ligando (K_{el1}) (esquema 2). Puesto que la constante es mayor para el aducto, la concentración crítica requerida para que se produzca el ensamblaje es menor.



Esquema 4. Esquema de reacción de los ligandos covalentes con la tubulina donde Mtb es el microtúbulo, Tub es el dímero, K_{el1} la constante de equilibrio del dímero con el microtúbulo, Tub-Lig el aducto y K_{el2} la constante de equilibrio del aducto con el microtúbulo.

En el caso de zampanolida se sabe que una vez que se forma el aducto, el bucle M se estructura tal como sucede con la epotilona o con el híbrido discodermolido-taxol (KS-1-1993-32) (Prota et al., 2013a). Esto hace que la energía libre de unión del aducto al microtúbulo sea menor, ya que no es necesario utilizar energía para estructurar el bucle M ($K_{el2} \gg K_{el1}$). El híbrido discodermolido-paclitaxel produce esta estabilización de la forma helicoidal y a pesar de haberse determinado una menor afinidad por los microtubulos, produce un ensamblaje mayor que el del discodermolido. Este hecho pone de manifiesto la relevancia que tiene la estructuración del bucle M en el proceso de inducción del ensamblaje.

Comparando las estructuras de complejos de tubulina con ligandos del sitio de taxol se ve que los taxanos se pueden dividir en dos grupos; aquellos que inducen el plegamiento del bucle M en una α -hélice (zampanolida, epotilona, DDM-paclitaxel) y aquellos que tienen poco efecto o ninguno sobre la estructuración del bucle (ciclostreptina, dictiostationa, discodermolido y taccalonolida AJ, Figura). Todos estos ligandos presentan interacciones hidrofóbicas con las hélicas H6, H7 y con el bucle M (Leu217, Leu219, Leu230, Ala233, Leu275, His229 y Asp226). De los compuesto del primer grupo además establecen interacciones con el bucle M a través de sus cadenas laterales induciendo la estructuración de éste hacia una conformación helicoidal (Figura A). La unión de los del segundo grupo permite la formación de interacciones con algunos residuos del bucle M (Arg278 y Gln282) favoreciendo una estructuración parcial, sin que éste llegue a plegarse en α -hélice (Figura B). En la estructura del complejo T2RT-ciclostreptina se ve que el anillo A de la ciclostreptina ocupa el espacio que normalmente ocuparía la cadena lateral de la Arg278 (Figura B), esto junto a la ausencia de contactos con el resto de residuos del bucle M hacen que haya una ausencia total de estructuración de este.

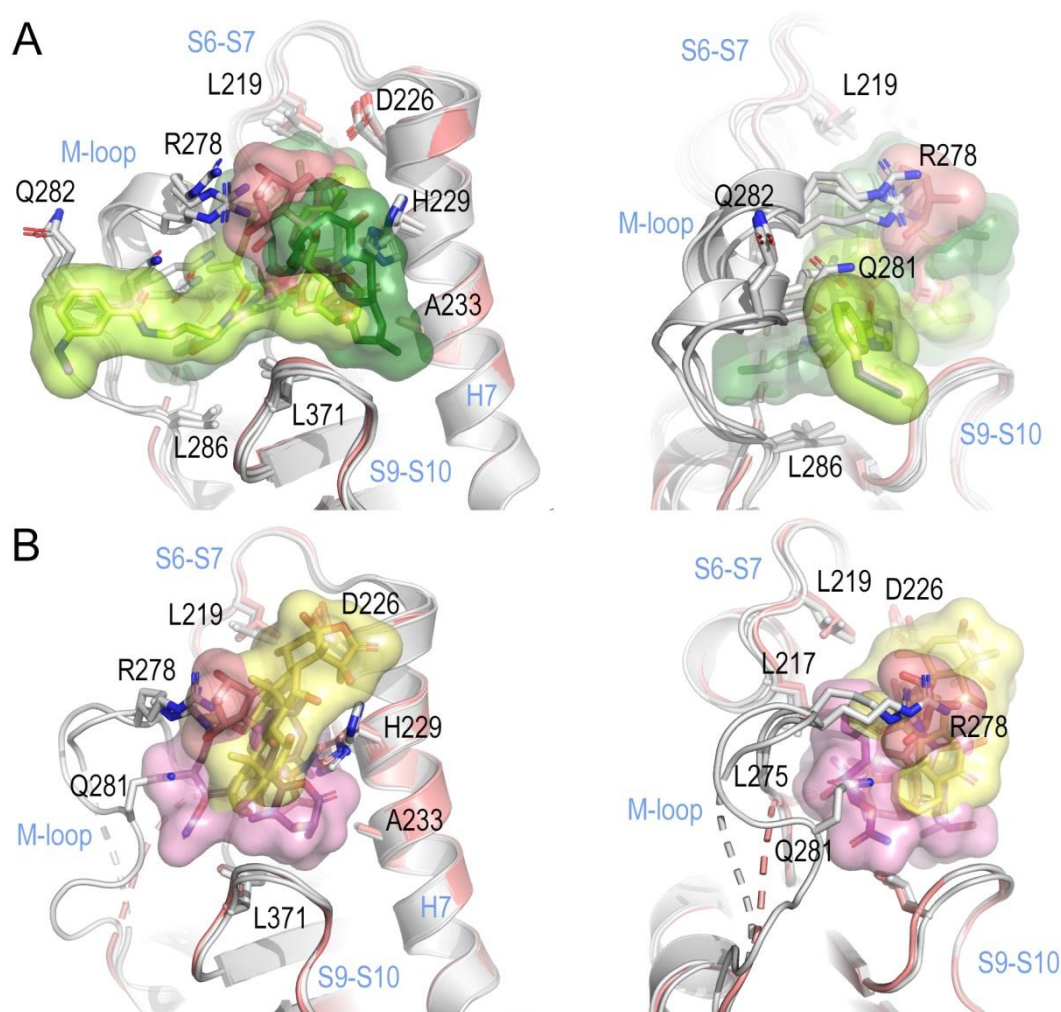


Figura 61: Estructuración del bucle M por diferentes ligandos del sitio de taxol. **A).** Superposición del complejo T2RT-Ciclostreptina (salmón) con los complejos T2RT-Zampanolida (verde oscuro, 4I4T, rmsd 0.175 Å, 371 átomos), T2RT-Epotilona (verde claro, 4I50, rmsd 0.234, 358 átomos) y del complejo T2RT con el híbrido DMM-paclitaxel (verde lima, 5LXS, rmsd 0.159, 348 átomos). Se presentan dos orientaciones remarcando el bucle M en conformación helicoidal. **B).** Superposición del complejo T2RT-Ciclostreptina (salmón) con los complejos de T2RT-DDM (rosa, 5LXT, rmsd 0.152, 378 átomos) y T2RT-Taccalonolida AJ (amarillo, 5EZY, rmsd 0.187, 369 átomos). Se remarca la estructuración parcial y la ausencia de conformación helicoidal en el bucle M.

5.2.3. La ciclostreptina produce un cambio en el bucle T5

La ciclostreptina no presenta ninguna interacción con el bucle M ni lo pliega, pero induce el ensamblaje de tubulin, por lo que el mecanismo de activación debe ser diferente. En la estructura cristalográfica se observa que la conformación del bucle T5 en la subunidad β es equivalente a la de tubulina-GTP (Pecqueur et al., 2012) a pesar de que el nucleótido unido en el sitio E es GDP y no GTP (Figura). La comparación de la conformación del bucle T5 en las estructuras analizadas anteriormente mostraron que en función de esto también existen dos tipos de compuestos; los que presentan el bucle T5 en conformación GDP y los que lo tienen en conformación GTP. Tanto zampanolida como epotilona, en los cuales se produce una fuerte estabilización del bucle M, la conformación del bucle T5 es GDP. Por otro lado, aquellos compuestos

que producen una estabilización parcial del bucle M, como son taccalonolida AJ y discodermolido, producen una conformación GTP del T5. El híbrido DDM-paclitaxel estabiliza el bucle M y estabiliza el bucle T5 en conformación GTP, pero este ligando posee las mismas interacciones que el discodermolido en la zona más cercana al bucle T5, por lo que no es de extrañar que produzca el mismo efecto. Sólo dictiostatina no presenta este tipo de correlación ya que ni estabiliza el bucle M ni induce la conformación GTP en el bucle T5.

La activación de la tubulina a través del cambio conformacional en el bucle T5 parece un mecanismo alternativo y eficaz en la inducción del ensamblaje, ya que se promueve la forma activa de tubulina. Por tanto en el proceso de inducción de la polimerización interviene tanto la estabilización de las interacciones laterales a través del cambio conformacional en el bucle M, como la estabilización de las interacciones longitudinales a través de un proceso alostérico debido al cambio en el bucle T5 tal como estaba propuesto (Kellogg et al., 2017).

5.2.4. Relación entre cambios estructurales, el poder de ensamblaje y la citotoxicidad en ligandos covalentes del sitio de taxol

La superposición de los diferentes ligandos covalentes del sitio de taxol ha revelado una correlación entre la estructuración del bucle M y la capacidad de ensamblaje. De los tres ligandos covalentes conocidos del sitio de taxol (ciclostreptina, zampanolida y taccalonolida AJ) solo la zampanolida induce el ensamblaje de tubulina en condiciones de magnesio bajas (3mM). Tal como se ha discutido en el apartado anterior, de los tres ligandos, la zampanolida es el único que produce una estabilización de la conformación helicoidal del bucle M. El aumento de la concentración de magnesio permite la inducción de la polimerización con taccalonolida AJ y ciclostreptina, de modo que la capacidad de ensamblaje es menor en el caso de estos dos ligandos. Es decir, la estabilización de la conformación helicoidal del bucle M es más efectivo en la inducción de formación de microtúbulos estables que la generación alostérica de una conformación de tubulina activa.

Esta correlación se ve reflejada también en la toxicidad que tienen los tres ligandos en las células HeLa y HeLa β III. La zampanolida es el compuesto que genera el plegamiento del bucle M e induce la mayor capacidad de ensamblaje en tubulina y a su vez, el que muestra una mayor actividad citotóxica en células HeLa. Taccalonolida y ciclostreptina sólo inducen alostéricamente el bucle T5 y ciclostreptina es la que tiene menor poder de activación del ensamblaje. A su vez, es la que produce menos citotoxicidad, por lo cual existe una relación entre la capacidad de inducir ensamblaje y la citotoxicidad.

5.2.5. La utilización de ligandos covalentes permite analizar los mecanismos de resistencia por sobreexpresión del isotipo β III

El efecto de los ligandos covalentes de la tubulina en células resistentes a fármacos por sobreexpresión a P-gp ha sido ampliamente estudiado (Marco et al., 2011; Risinger et al., 2011) , demostrándose que la unión covalente permite evadir

este tipo de resistencia al disminuir la posibilidad de que la proteína transportadora expulse el fármaco fuera de la célula. Sin embargo, el efecto de este tipo de unión sobre la resistencia debida a sobreexpresión de β III no ha sido estudiado en profundidad. Existen tres teorías acerca del mecanismo por el cual las células que sobreexpresan este isotipo de b-tubulina evaden la respuesta a fármacos: la primera establece que es debido a la menor afinidad de los fármacos por el isotipo β III (St George et al., 2015; Yeh et al., 2016); la segunda propone que el isotipo β III, al tener una mayor expresión en condiciones de estrés celular como hipoxia (Raspaglio et al., 2008) o privación de glucosa (Cicchillitti et al., 2008), podría actuar como un factor de supervivencia celular, enmascarando así el efecto de los ligandos sobre los microtúbulos; y la tercera teoría establece que la diferencia de dinamicidad de los microtúbulos en función de isotipos de b-tubulina, haría a éstos más resistentes al efecto de MSAs (Kamath et al., 2005).

En este trabajo se han empleado ligandos covalentes para entender el mecanismo de acción de la resistencia debida a sobreexpresión de β III, ya que con estos compuestos eliminamos la influencia que pueda tener la afinidad. Los resultados de citotoxicidad muestran que los tres compuestos covalentes mejoran la efectividad en células resistentes comparando con los valores del taxol. Pero aún existe una resistencia parcial al comparar los valores en la línea resistente con los valores de la HeLa sin transfectar. El hecho de que los ligandos covalentes no sean capaces de completamente evadir el mecanismo de resistencia indica que debe haber algún vía independiente de la unión del fármaco, que favorece la resistencia a estos compuestos y que podría ser la función de β III como factor de supervivencia o la estabilidad dinámica diferencial entre isotipos. La pironetina evade completamente el mecanismo de resistencia β III, siendo de hecho más citotóxica en las células transfectadas que en las células HeLa sin sobreexpresión. Por tanto, podemos descartar que esta resistencia se deba a la posible función de β III como factor de supervivencia celular. Si la causa de la resistencia estuviera relacionada con la función como factor de supervivencia, la pironetina y los ligandos covalentes del sitio de taxol tendrían un efecto similar sobre el índice de resistencia. El hecho de que un agente destabilizante covalente como es la pironetina tenga un efecto opuesto al que tienen los agentes estabilizantes covalentes del sitio de taxol, sugiere que el mecanismo de resistencia está relacionado con las diferencias en las dinámicas de polimerización del isotipo β III.

6

Conclusiones

Con respecto al compuesto Li5 y sus derivados:

1. De los compuestos analizados, tres presentan actividad citotóxica, siendo el Li5 el más activo de la serie, evadiendo los principales mecanismos de resistencia a fármacos descritos para compuestos dirigidos frente a tubulina (sobreexpresión de P-gp y de β III).
2. La diana biológica es la red microtubular, lo cual se corresponde con su unión *in vitro* a tubulina produciendo la despolimerización de esta.
3. El compuesto requiere de una conformación específica en el C7 del anillo de pirimidina para poder unirse, siendo su actividad dependiente del estado de oxidación.
4. El compuesto Li5 se une al sitio de colchicina con una afinidad especialmente alta comparada con otros ligandos del mismo sitio de unión, lo cual puede deberse a los enlaces por puentes de hidrógeno formados con la α T179 y β Cys239.
5. El Li5 no es tóxico *in vivo* y reduce el tamaño de tumores en ratones con xenotransplantes.

Con respecto al análisis estructural de la unión de ciclostreptina:

1. La ciclostreptina se une al sitio de taxol en β -tubulina y de forma covalente. La unión es a través de la His229 mediante una adición nucleofílica seguida de una protonación del intermediario. No se han encontrado evidencias de unión a la Thr220.
2. La ciclostreptina emplean un mecanismo alternativo de estabilización de microtúbulos. En lugar de actuar sobre los contactos laterales ayudando al plegamiento helicoidal del bucle M, alostéricamente genera un cambio conformacional en el bucle T5 que simula el estado activado de tubulina, reforzando los contactos longitudinales..
3. Existe una relación entre la capacidad de ensamblaje de los diferentes MSAs covalentes del sitio de taxol (zampanolida, taccalonolida AJ, ciclostreptina), el mecanismo de estabilización empleado (bucle M vs. bucle T5).
4. La citotóxicidad de los ligandos covalentes también está relacionada con su mecanismo de estabilización
5. La resistencia debido a sobreexpresión de β III en compuestos del sitio de taxol es debida a las diferencias en las dinámicas de polimerización de los distintos isotipos.

Bibliografía

Abajo, A., Bitarte, N., Zarate, R., Boni, V., Lopez, I., Gonzalez-Huarriz, M., Rodriguez, J., Bandres, E., and Garcia-Foncillas, J. (2012). Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array. *World J Gastroenterol* 18, 637-645.

Abal, M., Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* 3, 193-203.

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., *et al.* (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221.

Alejandro-Garcia, I., Alvarez, L., Cardoso-Taketa, A., Gonzalez-Maya, L., Antunez, M., Salas-Vidal, E., Diaz, J.F., Marquina-Bahena, S., and Villarreal, M.L. (2015). Cytotoxic Activity and Chemical Composition of the Root Extract from the Mexican Species *Linum scabrellum*:

Mechanism of Action of the Active Compound 6-Methoxypodophyllotoxin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015, 298463.

Altmann, K.H. (2003). Epothilone B and its analogs - a new family of anticancer agents. *Mini Rev Med Chem* 3, 149-158.

Altmann, K.H. (2017). Drugs from the Oceans: Marine Natural Products as Leads for Drug Discovery. *Chimia (Aarau)* 71, 646-652.

Alushin, G.M., Lander, G.C., Kellogg, E.H., Zhang, R., Baker, D., and Nogales, E. (2014). High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117-1129.

Amador, M.L., Jimeno, J., Paz-Ares, L., Cortes-Funes, H., and Hidalgo, M. (2003). Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol* 14, 1607-1615.

Andreu, J.M. (2007). Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. *Methods Mol Med* 137, 17-28.

Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001). The interaction of baccatin III with the taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.

Andreu, J.M., and Timasheff, S.N. (1982). Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6753-6756.

Andreu, J.M., Wagenknecht, T., and Timasheff, S.N. (1983). Polymerization of the tubulin-colchicine complex: relation to microtubule assembly. *Biochemistry* 22, 1556-1566.

Antunez-Mojica, M., Rodriguez-Salarichs, J., Redondo-Horcajo, M., Leon, A., Barasoain, I., Canales, A., Canada, F.J., Jimenez-Barbero, J., Alvarez, L., and Diaz, J.F. (2016). Structural and Biochemical Characterization of the Interaction of Tubulin with Potent Natural Analogues of Podophyllotoxin. *Journal of natural products* 79, 2113-2121.

Ayral-Kaloustian, S., Zhang, N., and Beyer, C. (2009). Cevipabulin (TTI-237): preclinical and clinical results for a novel antimicrotubule agent. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31, 443-447.

Baas, P.W. (2014). Beyond taxol: microtubule-based strategies for promoting nerve regeneration after injury. *Neural Regen Res* 9, 1265-1266.

Baas, P.W., and Ahmad, F.J. (2013). Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system. *Brain* 136, 2937-2951.

Bai, R., Nguyen, T.L., Burnett, J.C., Atasoylu, O., Munro, M.H., Pettit, G.R., Smith, A.B., 3rd, Gussio, R., and Hamel, E. (2011). Interactions of halichondrin B and eribulin with tubulin. *J Chem Inf Model* 51, 1393-1404.

Banerjee, A., and Luduena, R.F. (1992). Kinetics of colchicine binding to purified beta-tubulin isotypes from bovine brain. *J Biol Chem* 267, 13335-13339.

Banerjee, A., Roach, M.C., Trcka, P., and Luduena, R.F. (1990). Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. *J Biol Chem* 265, 1794-1799.

Banuelos-Hernandez, A.E., Mendoza-Espinoza, J.A., Pereda-Miranda, R., and Cerda-Garcia-Rojas, C.M. (2014). Studies of (-)-pironetin binding to alpha-tubulin: conformation, docking, and molecular dynamics. *J Org Chem* 79, 3752-3764.

Barbier, P., Dorleans, A., Devred, F., Sanz, L., Allegro, D., Alfonso, C., Knossow, M., Peyrot, V., and Andreu, J.M. (2010). Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J Biol Chem* 285, 31672-31681.

Berrieman, H.K., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2004). Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol* 5, 158-164.

Bhattacharya, R., and Cabral, F. (2009). Molecular basis for class V beta-tubulin effects on microtubule assembly and paclitaxel resistance. *J Biol Chem* 284, 13023-13032.

Bhattacharyya, B., and Wolff, J. (1977). Maytansine binding to the vinblastine sites of tubulin. *FEBS Lett* 75, 159-162.

Blain, J.C., Mok, Y.F., Kubanek, J., and Allingham, J.S. (2010). Two molecules of lobophorolide cooperate to stabilize an actin dimer using both their "ring" and "tail" region. *Chem Biol* 17, 802-807.

Bohnacker, T., Prota, A.E., Beaufils, F., Burke, J.E., Melone, A., Inglis, A.J., Rageot, D., Sele, A.M., Cmiljanovic, V., Cmiljanovic, N., *et al.* (2017). Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention. *Nat Commun* 8, 14683.

Bonandi, E., Foschi, F., Marucci, C., Dapiaggi, F., Sironi, M., Pieraccini, S., Christodoulou, M., de Asís Balaguer, F., Fernando Díaz, J., Zidar, N., *et al.* (2019). Synthesis of Thicolchicine-Based Conjugates: Investigation towards Bivalent Tubulin/Microtubules Binders, Vol 84.

Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1967). The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J Cell Biol* 34, 525-533.

Bouchard, H., Viskov, C., and Garcia-Echeverria, C. (2014). Antibody-drug conjugates-a new wave of cancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett* 24, 5357-5363.

Brain, E.G., Misset, J.L., and Rouess, J. (1999). Primary chemotherapy or hormonotherapy for patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 25, 187-197.

Brindisi, M., Olivieri, C., Alfano, G., Gemma, S., de Asis Balaguer, F., Khan, T., Grillo, A., Chemi, G., Menchon, G., Prota, A.E., *et al.* (2019). Structure-activity relationships, biological evaluation and structural studies of novel pyrrolonaphthoxazepines as antitumor agents. *Eur J Med Chem* 162, 290-320.

Brown, P.H., Balbo, A., and Schuck, P. (2008). Characterizing protein-protein interactions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Curr Protoc Immunol Chapter 18*, Unit 18 15.

Bryan, C., Rice, C., Hoffman, H., Harkisheimer, M., Sweeney, M., and Skordalakes, E. (2015). Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. *Structure* 23, 1934-1942.

Bueno, O., Estevez Gallego, J., Martins, S., Prota, A.E., Gago, F., Gomez-SanJuan, A., Camarasa, M.J., Barasoain, I., Steinmetz, M.O., Diaz, J.F., *et al.* (2018). High-affinity ligands of the colchicine domain in tubulin based on a structure-guided design. *Sci Rep* 8, 4242.

Buey, R.M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M.C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D., Day, B.W., Sorensen, E.J., *et al.* (2007). Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat Chem Biol* 3, 117-125.

Buey, R.M., Diaz, J.F., and Andreu, J.M. (2006). The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change. *Biochemistry* 45, 5933-5938.

Buey, R.M., Diaz, J.F., Andreu, J.M., O'Brate, A., Giannakakou, P., Nicolaou, K.C., Sasmal, P.K., Ritzen, A., and Namoto, K. (2004). Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity. *Chem Biol* 11, 225-236.

Burge, M., Francesconi, A.B., Kotasek, D., Fida, R., Smith, G., Wilks, A., Vasey, P.A., and Lickliter, J.D. (2013). Phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of CYT997, an orally-bioavailable cytotoxic and vascular-disrupting agent. *Invest New Drugs* 31, 126-135.

Burkes, R.L., Shepherd, F.A., Blackstein, M.E., Goldberg, M.E., Waters, P.F., Patterson, G.A., Todd, T., Pearson, F.G., Jones, D., Farooq, S., *et al.* (2005). Induction chemotherapy with mitomycin, vindesine, and cisplatin for stage IIIA (T1-3, N2) unresectable non-small-cell lung cancer: final results of the Toronto phase II trial. *Lung Cancer* 47, 103-109.

Buxo, E., Sosa, A., Reig, O., Victoria, I., Caballero, M., Grau, J.J., and Garcia-Morillo, M. (2018). Intravenous 5-Fluorouracil in Patients With Advanced Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 127, 456-462.

Canela, M.D., Noppen, S., Bueno, O., Prota, A.E., Bargsten, K., Saez-Calvo, G., Jimeno, M.L., Benkheil, M., Ribatti, D., Velazquez, S., *et al.* (2017). Antivascular and antitumor properties of the tubulin-binding chalcone TUB091. *Oncotarget* 8, 14325-14342.

Cicchillitti, L., Penci, R., Di Michele, M., Filippetti, F., Rotilio, D., Donati, M.B., Scambia, G., and Ferlini, C. (2008). Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol Cancer Ther* 7, 2070-2079.

Coggins, P.R., Ravdin, R.G., and Eisman, S.H. (1960). Clinical evaluation of a new alkylating agent: cytoxan (cyclophosphamide). *Cancer* 13, 1254-1260.

Conde, C., and Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-332.

Cone, N.J., Miller, R., and Neuss, N. (1963). Alkaloids of *Vinca rosea* Linn. (*Catharanthus roseus* G. Don). XV. Analysis of vinca alkaloids by thin-layer chromatography. *J Pharm Sci* 52, 688-692.

Cormier, A., Marchand, M., Ravelli, R.B., Knossow, M., and Gigant, B. (2008). Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. *EMBO Rep* 9, 1101-1106.

Cranwell, W.C., and Sinclair, R. (2017). Optimising cryosurgery technique. *Aust Fam Physician* 46, 270-274.

Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 12-21.

da Rocha, A.B., Lopes, R.M., and Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1, 364-369.

Dall'Acqua, S. (2014). Natural products as antimitotic agents. *Curr Top Med Chem* 14, 2272-2285.

Das, S.K., Menezes, M.E., Bhatia, S., Wang, X.Y., Emdad, L., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2015). Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *J Cell Physiol* 230, 259-271.

de Ines, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., Garcia, P., Briand, C., Renner, G.A., and Temple, C., Jr. (1994). Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res* 54, 75-84.

Diaz, J.F., and Buey, R.M. (2007). Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med* 137, 245-260.

Diaz, J.F., Menendez, M., and Andreu, J.M. (1993). Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* 32, 10067-10077.

Diaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A., and Andreu, J.M. (2000). Molecular recognition of taxol by microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J Biol Chem* 275, 26265-26276.

Dinareello, C.A., Wolff, S.M., Goldfinger, S.E., Dale, D.C., and Alling, D.W. (1974). Colchicine therapy for familial mediterranean fever. A double-blind trial. *N Engl J Med* **291**, 934-937.

Dixon, W.E., and Malden, W. (1908). Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone-marrow. *J Physiol* **37**, 50-76.

Dorleans, A., Gigant, B., Ravelli, R.B., Mailliet, P., Mikol, V., and Knossow, M. (2009). Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13775-13779.

Downing, K.H., and Nogales, E. (1998). Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 16-22.

Drake, J.M., Lee, J.K., and Witte, O.N. (2014). Clinical targeting of mutated and wild-type protein tyrosine kinases in cancer. *Mol Cell Biol* **34**, 1722-1732.

Duong-Ly, K.C., and Peterson, J.R. (2013). The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 2, Unit2* 9.

Eckford, P.D., and Sharom, F.J. (2009). ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* **109**, 2989-3011.

Edler, M.C., Buey, R.M., Gussio, R., Marcus, A.I., Vanderwal, C.D., Sorensen, E.J., Diaz, J.F., Giannakakou, P., and Hamel, E. (2005). Cyclostreptin (FR182877), an antitumor tubulin-polymerizing agent deficient in enhancing tubulin assembly despite its high affinity for the taxoid site. *Biochemistry* **44**, 11525-11538.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.

Evans, P.R., and Murshudov, G.N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69, 1204-1214.

Fernando Diaz, J., and Andreu, J.M. (1991). Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex. Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. *J Biol Chem* 266, 2890-2896.

Fidler, I.J., and Kripke, M.L. (2015). The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 34, 635-641.

Field, J.J., Northcote, P.T., Paterson, I., Altmann, K.H., Diaz, J.F., and Miller, J.H. (2017). Zampanolide, a Microtubule-Stabilizing Agent, Is Active in Resistant Cancer Cells and Inhibits Cell Migration. *Int J Mol Sci* 18.

Field, J.J., Pera, B., Calvo, E., Canales, A., Zurwerra, D., Trigili, C., Rodriguez-Salarichs, J., Matesanz, R., Kanakkanthara, A., Wakefield, S.J., *et al.* (2012). Zampanolide, a potent new microtubule-stabilizing agent, covalently reacts with the taxane luminal site in tubulin alpha,beta-heterodimers and microtubules. *Chem Biol* 19, 686-698.

Field, J.J., Pera, B., Gallego, J.E., Calvo, E., Rodriguez-Salarichs, J., Saez-Calvo, G., Zuverra, D., Jordi, M., Andreu, J.M., Prota, A.E., *et al.* (2018). Zampanolide Binding to Tubulin Indicates Cross-Talk of Taxane Site with Colchicine and Nucleotide Sites. *Journal of natural products* **81**, 494-505.

Findeisen, P., Muhlhausen, S., Dempewolf, S., Hertzog, J., Zietlow, A., Carlomagno, T., and Kollmar, M. (2014). Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol* **6**, 2274-2288.

Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., and Dou, Q.P. (2010). Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des* **16**, 1813-1825.

Gan, P.P., and Kavallaris, M. (2008). Tubulin-targeted drug action: functional significance of class ii and class IVb beta-tubulin in vinca alkaloid sensitivity. *Cancer Res* **68**, 9817-9824.

Gan, P.P., McCarroll, J.A., Po'uha, S.T., Kamath, K., Jordan, M.A., and Kavallaris, M. (2010). Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin. *Mol Cancer Ther* **9**, 1339-1348.

Grosse, P.Y., Bressolle, F., and Pinguet, F. (1998). In vitro modulation of doxorubicin and docetaxel antitumoral activity by methyl-beta-cyclodextrin. *Eur J Cancer* **34**, 168-174.

Guerrero, E., Abad, A., Montenegro, G., Del Olmo, E., Lopez-Perez, J.L., and San Feliciano, A. (2013). Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharm Biol* **51**, 566-572.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Himes, R.H., Burton, P.R., and Gaito, J.M. (1977). Dimethyl sulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins. *J Biol Chem* 252, 6222-6228.

Holtzman, A.L., Rotondo, R.L., Rutenberg, M.S., Indelicato, D.J., Mercado, C.E., Rao, D., Tavanaiepour, D., Morris, C.G., Louis, D., Flampouri, S., *et al.* (2019). Proton therapy for skull-base chondrosarcoma, a single-institution outcomes study. *J Neurooncol*.

Huxham, I.M., Barlow, A.L., Lewis, A.D., Plumb, J., Mairs, R.J., Gaze, M.N., and Workman, P. (1994). Differential intracellular processing of the anthracycline drug ME2303 in doxorubicin-sensitive (A2780) and -resistant (A2780AD) human ovarian cancer cells as studied with confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Int J Cancer* 59, 94-102.

Imazio, M., Bobbio, M., Cecchi, E., Demarie, D., Pomari, F., Moratti, M., Ghisio, A., Belli, R., and Trinchero, R. (2005). Colchicine as first-choice therapy for recurrent pericarditis: results of the CORE (COLchicine for REcurrent pericarditis) trial. *Arch Intern Med* 165, 1987-1991.

Jaroch, K., Karolak, M., Gorski, P., Jaroch, A., Krajewski, A., Ilnicka, A., Sloderbach, A., Stefanski, T., and Sobiak, S. (2016). Combretastatins: In vitro structure-activity relationship, mode of action and current clinical status. *Pharmacol Rep* 68, 1266-1275.

Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., and Thun, M.J. (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55, 10-30.

Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M. (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52, 23-47.

Jimenez, P.C., Wilke, D.V., and Costa-Lotufo, L.V. (2018). Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. *Clinics (Sao Paulo)* 73, e482s.

Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* 51, 2212-2222.

Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1997). Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry* 36, 10817-10821.

Julien, D.C., Behnke, S., Wang, G., Murdoch, G.K., and Hill, R.A. (2011). Utilization of monoclonal antibody-targeted nanomaterials in the treatment of cancer. *MAbs* 3, 467-478.

Junker, P., Puppe, J., Thangarajah, F., Domrose, C., Cepic, A., Morgenstern, B., Ratiu, D., Hellmich, M., Mallmann, P., and Wirtz, M. (2018). Neoadjuvant Therapy of Cervical Carcinoma with the Angiogenesis Inhibitor Bevacizumab: a Single-Centre Analysis. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 78, 768-774.

Kabsch, W. (2010). Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132.

Kamath, K., Wilson, L., Cabral, F., and Jordan, M.A. (2005). BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem* 280, 12902-12907.

- Kanakkanthara, A., Rowe, M.R., Field, J.J., Northcote, P.T., Teesdale-Spittle, P.H., and Miller, J.H. (2015). β -tubulin mutations in the laulimalide/peloruside binding site mediate drug sensitivity by altering drug-tubulin interactions and microtubule stability. *Cancer Lett* 365, 251-260.
- Kang, H., Xiao, X., Huang, C., Yuan, Y., Tang, D., Dai, X., and Zeng, X. (2018). Potent aromatase inhibitors and molecular mechanism of inhibitory action. *Eur J Med Chem* 143, 426-437.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 10, 194-204.
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.
- Kellogg, E.H., Hejab, N.M.A., Howes, S., Northcote, P., Miller, J.H., Diaz, J.F., Downing, K.H., and Nogales, E. (2017). Insights into the Distinct Mechanisms of Action of Taxane and Non-Taxane Microtubule Stabilizers from Cryo-EM Structures. *J Mol Biol* 429, 633-646.
- Klaunig, J.E. (2019). Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*.
- Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Nishide, M., Nishikiori, T., Nakagawa, T., and Shimada, N. (1995). Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. III. Biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 48, 893-895.
- Kondoh, M., Usui, T., Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Nishikawa, K., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1998). Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Lett* 126, 29-32.

Kondoh, M., Usui, T., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1999). Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem J* 340 (Pt 2), 411-416.

Lakowicz, J.R. (1988). Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. *Subcell Biochem* 13, 89-126.

Lambert, J.M., and Chari, R.V. (2014). Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *J Med Chem* 57, 6949-6964.

le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R., and Gambacorti-Passerini, C. (2000). Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95, 1758-1766.

Leandro-Garcia, L.J., Leskela, S., Landa, I., Montero-Conde, C., Lopez-Jimenez, E., Leton, R., Cascon, A., Robledo, M., and Rodriguez-Antona, C. (2010). Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 214-223.

Lee, E.Y., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003236.

Li, J., Li, G., and Xu, W. (2013). Histone deacetylase inhibitors: an attractive strategy for cancer therapy. *Curr Med Chem* 20, 1858-1886.

Li, L., Jiang, S., Li, X., Liu, Y., Su, J., and Chen, J. (2018). Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *Eur J Med Chem* 151, 482-494.

- Li, W., Sun, H., Xu, S., Zhu, Z., and Xu, J. (2017). Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: a perspective of privileged structures. *Future Med Chem* 9, 1765-1794.
- Lin, C.M., Hamel, E., and Wolpert-DeFilippes, M.K. (1981). Binding of maytansine to tubulin: competition with other mitotic inhibitors. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 31, 443-451.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313, 1045-1057.
- Lu, W., and Gelfand, V.I. (2017). Moonlighting Motors: Kinesin, Dynein, and Cell Polarity. *Trends Cell Biol* 27, 505-514.
- Ludueno, R.F. (2013). A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 302, 41-185.
- Luo, M., and Fu, L.W. (2014). Redundant kinase activation and resistance of EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Am J Cancer Res* 4, 608-628.
- Magiera, M.M., and Janke, C. (2014). Post-translational modifications of tubulin. *Curr Biol* 24, R351-354.
- Mandelbaum-Shavit, F., Wolpert-DeFilippes, M.K., and Johns, D.G. (1976). Binding of maytansine to rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 72, 47-54.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.

Marco, J.A., Garcia-Pla, J., Carda, M., Murga, J., Falomir, E., Trigili, C., Notararigo, S., Diaz, J.F., and Barasoain, I. (2011). Design and synthesis of pironetin analogues with simplified structure and study of their interactions with microtubules. *Eur J Med Chem* **46**, 1630-1637.

Mata-Molanes, J.J., Sureda Gonzalez, M., Valenzuela Jimenez, B., Martinez Navarro, E.M., and Brugarolas Masllorens, A. (2017). Cancer Immunotherapy with Cytokine-Induced Killer Cells. *Target Oncol* **12**, 289-299.

Matamoros, A.J., and Baas, P.W. (2016). Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Res Bull* **126**, 217-225.

Matesanz, R., Barasoain, I., Yang, C.G., Wang, L., Li, X., de Ines, C., Coderch, C., Gago, F., Barbero, J.J., Andreu, J.M., *et al.* (2008). Optimization of taxane binding to microtubules: binding affinity dissection and incremental construction of a high-affinity analog of paclitaxel. *Chem Biol* **15**, 573-585.

Menchon, G., Prota, A.E., Lucena-Agell, D., Bucher, P., Jansen, R., Irschik, H., Muller, R., Paterson, I., Diaz, J.F., Altmann, K.H., *et al.* (2018). A fluorescence anisotropy assay to discover and characterize ligands targeting the maytansine site of tubulin. *Nat Commun* **9**, 2106.

Millward, M., Mainwaring, P., Mita, A., Federico, K., Lloyd, G.K., Reddinger, N., Nawrocki, S., Mita, M., and Spear, M.A. (2012). Phase 1 study of the novel vascular disrupting agent plinabulin (NPI-2358) and docetaxel. *Invest New Drugs* **30**, 1065-1073.

Minoura, I., Hachikubo, Y., Yamakita, Y., Takazaki, H., Ayukawa, R., Uchimura, S., and Muto, E. (2013). Overexpression, purification, and functional analysis of recombinant human tubulin dimer. *FEBS Lett* **587**, 3450-3455.

Mirigian, M., Mukherjee, K., Bane, S.L., and Sackett, D.L. (2013). Measurement of in vitro microtubule polymerization by turbidity and fluorescence. *Methods Cell Biol* 115, 215-229.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.

Moliner, J.V., Valverde, A.G., and Sorolla, J.M. (2011). [Loa loa meningoencephalitis secondary to treatment with mebendazol]. *Med Clin (Barc)* 136, 228-229.

Mooberry, S.L., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A., and Davidson, B.S. (1999).

Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* 59, 653-660.

Morgan, L. (2008). Colchicine in acute gout. *Aust Fam Physician* 37, 103; author reply 103.

Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30, 2785-2791.

Mukhtar, E., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. (2014). Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 13, 275-284.

Murray, M.L., Meadows, J., Dore, C.J., Copas, A.J., Haddow, L.J., Lacey, C., Jit, M., Soldan, K., Bennett, K., Tetlow, M., *et al.* (2018). Human papillomavirus infection: protocol for a randomised controlled trial of imiquimod cream (5%) versus podophyllotoxin cream (0.15%), in combination with quadrivalent human papillomavirus or control vaccination in the treatment

and prevention of recurrence of anogenital warts (HIPvac trial). *BMC Med Res Methodol* 18, 125.

Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D., and Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 38, 890-903.

Ngan, V.K., Bellman, K., Panda, D., Hill, B.T., Jordan, M.A., and Wilson, L. (2000). Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules. *Cancer Res* 60, 5045-5051.

Nidorf, S.M., Eikelboom, J.W., Budgeon, C.A., and Thompson, P.L. (2013). Low-dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 61, 404-410.

Nitiss, J.L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 9, 338-350.

Niu, L., Wang, Y., Wang, C., Wang, Y., Jiang, X., Ma, L., Wu, C., Yu, Y., and Chen, Q. (2017). Structure of 4'-demethylepipodophyllotoxin in complex with tubulin provides a rationale for drug design. *Biochem Biophys Res Commun* 493, 718-722.

Noble, R.L., Beer, C.T., and Cutts, J.H. (1958). Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann N Y Acad Sci* 76, 882-894.

Nogales, E., Downing, K.H., Amos, L.A., and Lowe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* **96**, 79-88.

Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199-203.

Ogris, M. (2010). Cancer gene therapies come of age. *Ther Deliv* **1**, 211-214.

Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., and Horwitz, S.B. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**, 7280-7295.

Pamula, M.C., Ti, S.C., and Kapoor, T.M. (2016). The structured core of human beta tubulin confers isotype-specific polymerization properties. *J Cell Biol* **213**, 425-433.

Pecqueur, L., Duellberg, C., Dreier, B., Jiang, Q., Wang, C., Pluckthun, A., Surrey, T., Gigant, B., and Knossow, M. (2012). A designed ankyrin repeat protein selected to bind to tubulin caps the microtubule plus end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12011-12016.

Pegoraro, A.F., Janmey, P., and Weitz, D.A. (2017). Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**.

Pera, B., Barasoain, I., Pantazopoulou, A., Canales, A., Matesanz, R., Rodriguez-Salarichs, J., Garcia-Fernandez, L.F., Moneo, V., Jimenez-Barbero, J., Galmarini, C.M., *et al.* (2013). New interfacial microtubule inhibitors of marine origin, PM050489/PM060184, with potent antitumor activity and a distinct mechanism. *ACS Chem Biol* **8**, 2084-2094.

Philo, J.S. (2009). A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates. *Curr Pharm Biotechnol* 10, 359-372.

Pronzato, P., and Rondini, M. (2005). Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol* 16 Suppl 4, iv80-84.

Prota, A.E., Bargsten, K., Diaz, J.F., Marsh, M., Cuevas, C., Liniger, M., Neuhaus, C., Andreu, J.M., Altmann, K.H., and Steinmetz, M.O. (2014a). A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13817-13821.

Prota, A.E., Bargsten, K., Northcote, P.T., Marsh, M., Altmann, K.H., Miller, J.H., Diaz, J.F., and Steinmetz, M.O. (2014b). Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew Chem Int Ed Engl* 53, 1621-1625.

Prota, A.E., Bargsten, K., Redondo-Horcajo, M., Smith, A.B., 3rd, Yang, C.H., McDaid, H.M., Paterson, I., Horwitz, S.B., Fernando Diaz, J., and Steinmetz, M.O. (2017). Structural Basis of Microtubule Stabilization by Discodermolide. *Chembiochem* 18, 905-909.

Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J.J., Diaz, J.F., Altmann, K.H., and Steinmetz, M.O. (2013a). Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339, 587-590.

Prota, A.E., Danel, F., Bachmann, F., Bargsten, K., Buey, R.M., Pohlmann, J., Reinelt, S., Lane, H., and Steinmetz, M.O. (2014c). The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J Mol Biol* 426, 1848-1860.

- Prota, A.E., Magiera, M.M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C.C., Kammerer, R.A., Janke, C., *et al.* (2013b). Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J Cell Biol* 200, 259-270.
- Prota, A.E., Setter, J., Waight, A.B., Bargsten, K., Murga, J., Diaz, J.F., and Steinmetz, M.O. (2016). Pironetin Binds Covalently to alphaCys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of alpha-Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *J Mol Biol* 428, 2981-2988.
- Pukander, J., Kerala, J., Makitie, A., Hyrynkangas, K., Virtaniemi, J., and Grenman, R. (2001). Endoscopic laser surgery for laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258, 236-239.
- Raspaglio, G., Filippetti, F., Prislei, S., Penci, R., De Maria, I., Cicchillitti, L., Mozzetti, S., Scambia, G., and Ferlini, C. (2008). Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene* 409, 100-108.
- Ravelli, R.B., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., and Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428, 198-202.
- Risinger, A.L., Jackson, E.M., Polin, L.A., Helms, G.L., LeBoeuf, D.A., Joe, P.A., Hopper-Borge, E., Luduena, R.F., Kruh, G.D., and Mooberry, S.L. (2008). The taccalonolides: microtubule stabilizers that circumvent clinically relevant taxane resistance mechanisms. *Cancer Res* 68, 8881-8888.
- Risinger, A.L., Natarajan, M., Thomas, C.R., Jr., and Mooberry, S.L. (2011). The taccalonolides, novel microtubule stabilizers, and gamma-radiation have additive effects on cellular viability. *Cancer Lett* 307, 104-111.

Roberson, M.D., Toews, A.D., Goodrum, J.F., and Morell, P. (1992). Neurofilament and tubulin mRNA expression in Schwann cells. *J Neurosci Res* 33, 156-162.

Roldan, S., Cardona, A., Conesa, L., Murga, J., Falomir, E., Carda, M., and Marco, J.A. (2016). Synthesis and biological evaluation of simplified pironetin analogues with modifications in the side chain and the lactone ring. *Org Biomol Chem* 15, 220-232.

Saez-Calvo, G., Sharma, A., Balaguer, F.A., Barasoain, I., Rodriguez-Salarichs, J., Olieric, N., Munoz-Hernandez, H., Berbis, M.A., Wendeborn, S., Penalva, M.A., *et al.* (2017). Triazolopyrimidines Are Microtubule-Stabilizing Agents that Bind the Vinca Inhibitor Site of Tubulin. *Cell Chem Biol* 24, 737-750 e736.

Sau, S., Alsaab, H.O., Kashaw, S.K., Tatiparti, K., and Iyer, A.K. (2017). Advances in antibody-drug conjugates: A new era of targeted cancer therapy. *Drug Discov Today* 22, 1547-1556.

Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78, 1606-1619.

Schuck, P., and Demeler, B. (1999). Direct sedimentation analysis of interference optical data in analytical ultracentrifugation. *Biophys J* 76, 2288-2296.

Seclen, E. (2014). Bone marrow transplant to fight cancer and HIV infection. *AIDS Rev* 16, 53-54.

Seelig, A., and Landwojtowicz, E. (2000). Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur J Pharm Sci* 12, 31-40.

- Sharma, A., Saez-Calvo, G., Olieric, N., de Asis Balaguer, F., Barasoain, I., Lamberth, C., Diaz, J.F., and Steinmetz, M.O. (2017). Quinolin-6-Yloxyacetamides Are Microtubule Destabilizing Agents That Bind to the Colchicine Site of Tubulin. *Int J Mol Sci* *18*.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* *63*, 11-30.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* *68*, 7-30.
- Silverberg, E. (1980). Cancer statistics, 1980. *CA Cancer J Clin* *30*, 23-38.
- Silverberg, E. (1985). Cancer statistics, 1985. *CA Cancer J Clin* *35*, 19-35.
- Silverberg, E., Boring, C.C., and Squires, T.S. (1990). Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin* *40*, 9-26.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* *150*, 76-85.
- St George, M., Ayoub, A.T., Banerjee, A., Churchill, C.D., Winter, P., Klobukowski, M., Cass, C.E., Luduena, R.F., Tuszyński, J.A., and Damaraju, S. (2015). Designing and Testing of Novel Taxanes to Probe the Highly Complex Mechanisms by Which Taxanes Bind to Microtubules and Cause Cytotoxicity to Cancer Cells. *PLoS One* *10*, e0129168.
- Steeg, P.S. (2016). Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* *16*, 201-218.

- Stehn, J.R., Haass, N.K., Bonello, T., Desouza, M., Kottyan, G., Treutlein, H., Zeng, J., Nascimento, P.R., Sequeira, V.B., Butler, T.L., *et al.* (2013). A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. *Cancer Res* 73, 5169-5182.
- Steinmetz, M.O., and Prota, A.E. (2018). Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 28, 776-792.
- Storoni, L.C., McCoy, A.J., and Read, R.J. (2004). Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 432-438.
- Suehisa, S., Tagami, H., Inoue, F., Matsumoto, K., and Yoshikuni, K. (1983). Colchicine in the treatment of acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet's syndrome). *Br J Dermatol* 108, 99-101.
- Swain, S.M., and Arezzo, J.C. (2008). Neuropathy associated with microtubule inhibitors: diagnosis, incidence, and management. *Clin Adv Hematol Oncol* 6, 455-467.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70, 5649-5669.
- Tanabe, K. (2017). Microtubule Depolymerization by Kinase Inhibitors: Unexpected Findings of Dual Inhibitors. *Int J Mol Sci* 18.
- Tang, Y., Rodriguez-Salarichs, J., Zhao, Y., Cai, P., Estevez-Gallego, J., Balaguer-Perez, F., Redondo Horcajo, M., Lucena-Agell, D., Barasoain, I., Diaz, J.F., *et al.* (2017). Modification of C-seco taxoids through ring tethering and substituent replacement leading to effective agents

against tumor drug resistance mediated by betaIII-Tubulin and P-glycoprotein (P-gp) overexpressions. *Eur J Med Chem* 137, 488-503.

Tong, M., and Seeliger, M.A. (2015). Targeting conformational plasticity of protein kinases. *ACS Chem Biol* 10, 190-200.

Torijano-Gutierrez, S., Vilanova, C., Diaz-Oltra, S., Murga, J., Falomir, E., Carda, M., Redondo-Horcajo, M., Diaz, J.F., Barasoain, I., and Marco, J.A. (2015). The Mechanism of the Interactions of Pironetin Analog/Combretastatin A-4 Hybrids with Tubulin. *Arch Pharm (Weinheim)* 348, 541-547.

Torre, L.A., Siegel, R.L., Ward, E.M., and Jemal, A. (2016). Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25, 16-27.

Trendowski, M. (2014). Exploiting the cytoskeletal filaments of neoplastic cells to potentiate a novel therapeutic approach. *Biochim Biophys Acta* 1846, 599-616.

Trigili, C., Barasoain, I., Sanchez-Murcia, P.A., Bargsten, K., Redondo-Horcajo, M., Nogales, A., Gardner, N.M., Meyer, A., Naylor, G.J., Gomez-Rubio, E., *et al.* (2016). Structural Determinants of the Dictyostatin Chemotype for Tubulin Binding Affinity and Antitumor Activity Against Taxane- and Epothilone-Resistant Cancer Cells. *ACS Omega* 1, 1192-1204.

Tuszynski, J.A., Carpenter, E.J., Huzil, J.T., Malinski, W., Luchko, T., and Luduena, R.F. (2006). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int J Dev Biol* 50, 341-358.

Usui, T., Watanabe, H., Nakayama, H., Tada, Y., Kanoh, N., Kondoh, M., Asao, T., Takio, K., Watanabe, H., Nishikawa, K., *et al.* (2004). The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of alpha-tubulin. *Chem Biol* 11, 799-806.

Vineis, P., and Wild, C.P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet* 383, 549-557.

Walsh, D.A., Perkins, J.P., and Krebs, E.G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243, 3763-3765.

Wang, Y., Yu, Y., Li, G.B., Li, S.A., Wu, C., Gigant, B., Qin, W., Chen, H., Wu, Y., Chen, Q., *et al.* (2017). Mechanism of microtubule stabilization by taccalonolide AJ. *Nat Commun* 8, 15787.

Wang, Y., Zhang, H., Gigant, B., Yu, Y., Wu, Y., Chen, X., Lai, Q., Yang, Z., Chen, Q., and Yang, J. (2016). Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J* 283, 102-111.

Watanabe, H., Watanabe, H., Usui, T., Kondoh, M., Osada, H., and Kitahara, T. (2000). Synthesis of pironetin and related analogs: studies on structure-activity relationships as tubulin assembly inhibitors. *J Antibiot (Tokyo)* 53, 540-545.

Weisenberg, R.C., Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7, 4466-4479.

West, L.M., Northcote, P.T., and Battershill, C.N. (2000). Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the new zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 65, 445-449.

- Widlund, P.O., Podolski, M., Reber, S., Alper, J., Storch, M., Hyman, A.A., Howard, J., and Drechsel, D.N. (2012). One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Mol Biol Cell* 23, 4393-4401.
- Wieczorek, M., Tcherkezian, J., Bernier, C., Prota, A.E., Chaaban, S., Rolland, Y., Godbout, C., Hancock, M.A., Arezzo, J.C., Ocal, O., *et al.* (2016). The synthetic diazonamide DZ-2384 has distinct effects on microtubule curvature and dynamics without neurotoxicity. *Sci Transl Med* 8, 365ra159.
- Wyld, L., Audisio, R.A., and Poston, G.J. (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 12, 115-124.
- Yang, C.H., and Horwitz, S.B. (2017). Taxol((R)): The First Microtubule Stabilizing Agent. *Int J Mol Sci* 18.
- Yang, H., and Cabral, F. (2007). Heightened sensitivity to paclitaxel in Class IVa beta-tubulin-transfected cells is lost as expression increases. *J Biol Chem* 282, 27058-27066.
- Yang, H., Jaeger, M., Walker, A., Wei, D., Leiker, K., and Weitao, T. (2018). Break Breast Cancer Addiction by CRISPR/Cas9 Genome Editing. *J Cancer* 9, 219-231.
- Yang, J., Wang, Y., Wang, T., Jiang, J., Botting, C.H., Liu, H., Chen, Q., Yang, J., Naismith, J.H., Zhu, X., *et al.* (2016). Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of alpha-tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 7, 12103.
- Yang, L.P. (2010). Oral colchicine (Colcrys): in the treatment and prophylaxis of gout. *Drugs* 70, 1603-1613.

Yeh, L.C., Banerjee, A., Prasad, V., Tuszynski, J.A., Weis, A.L., Bakos, T., Yeh, I.T., Luduena, R.F., and Lee, J.C. (2016). Effect of CH-35, a novel anti-tumor colchicine analogue, on breast cancer cells overexpressing the betaIII isotype of tubulin. *Invest New Drugs* 34, 129-137.

Yoshida, M., Matsui, Y., Ikarashi, Y., Usui, T., Osada, H., and Wakasugi, H. (2007). Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res* 27, 729-736.

Zemer, D., Revach, M., Pras, M., Modan, B., Schor, S., Sohar, E., and Gafni, J. (1974). A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial mediterranean fever. *N Engl J Med* 291, 932-934.

Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M.P., and Boutros, M. (2018). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin Cancer Biol.*

Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., and Nogales, E. (2015). Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. *Cell* 162, 849-859.

Zhao, W., Zhou, C., Guan, Z.Y., Yin, P., Chen, F., and Tang, Y.J. (2017). Structural Insights into the Inhibition of Tubulin by the Antitumor Agent 4beta-(1,2,4-triazol-3-ylthio)-4-deoxypodophyllotoxin. *ACS Chem Biol* 12, 746-752.